

Maria Gabriela Bello Koblitz
Coordenadora

Bioquímica de Alimentos

Teoria e Aplicações Práticas





Bioquímica de Alimentos

Teoria e Aplicações Práticas

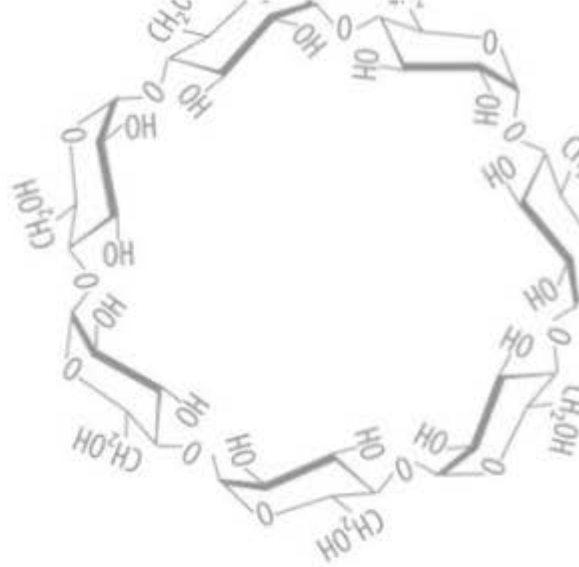


O GEN | Grupo Editorial Nacional – maior plataforma editorial brasileira no segmento científico, técnico e profissional – publica conteúdos nas áreas de ciências da saúde, exatas, humanas, jurídicas e sociais aplicadas, além de prover serviços direcionados à educação continuada e à preparação para concursos.

As editoras que integram o GEN, das mais respeitadas no mercado editorial, construíram catálogos inigualáveis, com obras decisivas para a formação acadêmica e o aperfeiçoamento de várias gerações de profissionais e estudantes, tendo se tornado sinônimo de qualidade e seriedade.

A missão do GEN e dos núcleos de conteúdo que o compõem é prover a melhor informação científica e distribuí-la de maneira flexível e conveniente, a preços justos, gerando benefícios e servindo a autores, docentes, livreiros, funcionários, colaboradores e acionistas.

Nosso comportamento ético incondicional e nossa responsabilidade social e ambiental são reforçados pela natureza educacional de nossa atividade e dão sustentabilidade ao crescimento contínuo e à rentabilidade do grupo.



Bioquímica de Alimentos

Teoria e Aplicações Práticas

Maria Gabriela Bello Koblitz

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro — UFRRJ. Mestre em Tecnologia de Alimentos e Doutora em Ciência de Alimentos (área de Bioquímica) pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. Professora Adjunta do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Feira de Santana — UEFS.



■ A autora deste livro e a EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA. empenharam seus melhores esforços para assegurar que as dosagens dos fármacos e os procedimentos apresentados no texto estejam em acordo com os padrões aceitos à época da publicação. Entretanto, tendo em conta a evolução das ciências da saúde, as mudanças regulamentares governamentais e o constante fluxo de novas informações sobre terapêutica medicamentosa e reações adversas a fármacos, recomendamos enfaticamente que os leitores consultem sempre outras fontes fidedignas, de modo a se certificarem de que as informações contidas neste livro estão corretas e de que não houve alterações nas dosagens recomendadas. Isso é particularmente importante quando se tratar de fármacos novos ou de medicamentos utilizados com pouca frequência.

■ A autora e a editora se empenharam para citar adequadamente e dar o devido crédito a todos os detentores de direitos autorais de qualquer material utilizado neste livro, dispondo-se a possíveis acertos posteriores caso, inadvertida e involuntariamente, a identificação de algum deles tenha sido omitida.

Direitos exclusivos para a língua portuguesa

Copyright © 2008 by

EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.

Uma editora integrante do GEN | Grupo Editorial Nacional

Publicado pela Editora LAB, sociedade por cotas de participação e de parceria operacional da EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.

Reservados todos os direitos. É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, em quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição pela Internet ou outros), sem permissão, por escrito, da EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.

Travessa do Ouvidor, 11

Rio de Janeiro — RJ — CEP 20040-040

Tels.: (21) 3543-0770 / (11) 5080-0770 | Fax: (21) 3543-0896

www.grupogen.com.br

editorial.saude@grupogen.com.br

Capa: Bernard Design

Projeto gráfico: Editora LAB

Editoração eletrônica: Anthares

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO-NA-FONTE
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ

K79b

Koblitz, Maria Gabriela Bello

Bioquímica de Alimentos : Teoria e Aplicações Práticas / Maria Gabriela Bello Koblitz. - [Reimpr.] - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2017.
il.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-277-1384-9

1. Alimentos - Análise. 2. Tecnologia de alimentos. 3. Nutrição. 4. Bioquímica. I. Título.

08-0565.

CDD: 664

CDU: 664

Colaboradores



Ângelo Pedro Jacomino

Engenheiro Agrônomo e Mestre pela Universidade Estadual Paulista — UNESP. Doutor (área de Fitotecnia) pela Universidade de São Paulo — USP, em 1999. Professor do Departamento de Produção Vegetal da Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz — USP/ESALQ — na área de Fisiologia e Tecnologia Pós-colheita de Frutas e Hortaliças. Pesquisador do CNPq.

Denise Maria Pinheiro

Graduada em Química pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro — UFRJ. Mestre em Ciências (área de Microbiologia Industrial) pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro — UFRJ. Doutora em Ciência de Alimentos (área de Bioquímica de Alimentos) pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. Professora Adjunta do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas — UFAL — e Responsável pelo Laboratório de Biotransformação de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas — UFAL.

Ilana Urbano Bron

Graduada em Engenharia Agrônoma. Mestre em Ciências (área de Fisiologia e Bioquímica de Plantas) e Doutora em Agronomia (área de Fitotecnia) pela Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz — ESALQ. Pesquisadora Científica do Instituto Agrônomo — IAC.

Izrael Gressoni Junior

Engenheiro de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. Mestre em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. Ex-Professor e Supervisor do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Metodista de Piracicaba — UNIMEP. Professor no Curso de Tecnologia de Alimentos da Fundação Hermínio Ometto (Uniararas) e nos Cursos de Engenharia de Alimentos, Engenharia de Produção e Engenharia de Controle e Automação da Faculdade de Jaguariúna (FAJ).

Luciana Ferracini dos Santos

Graduada em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. Mestre em Ciência de Alimentos e Doutora em Ciência de Alimentos (área de Bioquímica) pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. Professora de Química do Ensino Médio.

Marco Antonio Trindade

Engenheiro de Alimentos pela Universidade Estadual Paulista — UNESP. Mestre em Ciência da Nutrição (área de Nutrição Aplicada à Tecnologia de Alimentos). Doutor em Tecnologia de Alimentos (área de Tecnologia de Carnes e Derivados) pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. Professor do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga — FZEA/USP.

Maria Cecília de Arruda

Mestre em Agronomia (área de Fitotecnia) pela Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz — USP/ESALQ. Doutoranda em Agronomia (área de Fitotecnia) pela Universidade de São Paulo — USP. Pesquisadora Científica da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Unidade de Pesquisa de Bauru. Atua na área de Agronomia, com Ênfase em Pós-colheita e Tecnologia de Alimentos.

Ricardo Alfredo Kluge

Mestre pela Universidade Federal de Pelotas — UFPel (área de Fruticultura de Clima Temperado). Doutor (área de Fitotecnia) pela Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz — USP/ESALQ. Professor do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz — ESALQ. Atua na área de Fisiologia Vegetal, com Ênfase na Fisiologia Pós-colheita. Pesquisador do CNPq.

Severino Matias de Alencar

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro — UFRRJ. Mestre em Agronomia e Doutor em Ciência de Alimentos (área de Bioquímica) pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. Professor do Curso de Ciências de Alimentos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo — USP/ESALQ.

Prefácio

Não é fácil enfrentar a tarefa de publicar um livro, mesmo quando se conta com a contribuição valiosa de colaboradores de grande conhecimento científico. Portanto, fico muito feliz por ter conseguido chegar incólume ao fim do percurso e por poder levar este livro a estudantes e profissionais das áreas de Bioquímica, Engenharia de Alimentos, Nutrição e outras ciências nas quais a Bioquímica de Alimentos tem aplicação tão fundamental.

Além dessa satisfação, publicar esta obra me deixa menos inquieta com uma contradição de certo modo perturbadora: por que um assunto dessa importância é tão carente de literatura em português?

Se considerarmos que a Bioquímica de Alimentos é a ciência que visa a proporcionar alimentos de

alta qualidade, com respeito ao meio ambiente e com redução do custo de produção, é de fato perturbador que não houvesse até agora um texto em que fossem abordadas a teoria e a prática dessa ciência.

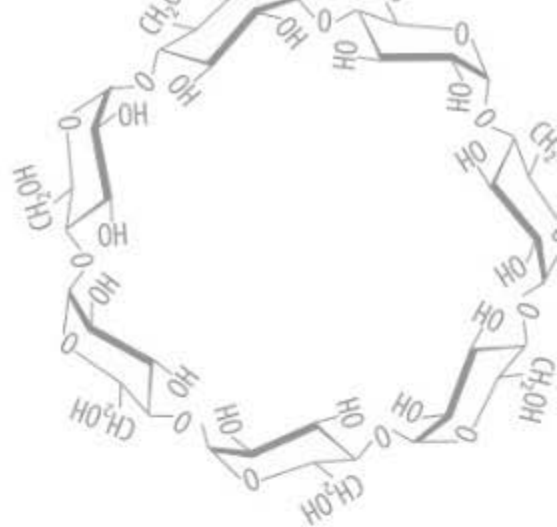
Foi com isso em mente que, ao planejar este livro, tive dois propósitos que se completam: preencher um hiato na literatura científica e contribuir para a difusão das boas práticas da Bioquímica de Alimentos.

Desejo que este trabalho cumpra, de fato, essa missão e seja útil para a boa formação acadêmica e para o aprimoramento dos profissionais aos quais o livro se destina. Se isso ocorrer, tanto eu como os colaboradores estaremos recompensados.

Maria Gabriella Bello Koblitz



Prefácio



Não é fácil enfrentar a tarefa de publicar um livro, mesmo quando se conta com a contribuição valiosa de colaboradores de grande conhecimento científico. Portanto, fico muito feliz por ter conseguido chegar incólume ao fim do percurso e por poder levar este livro a estudantes e profissionais das áreas de Bioquímica, Engenharia de Alimentos, Nutrição e outras ciências nas quais a Bioquímica de Alimentos tem aplicação tão fundamental.

Além dessa satisfação, publicar esta obra me deixa menos inquieta com uma contradição de certo modo perturbadora: por que um assunto dessa importância é tão carente de literatura em português?

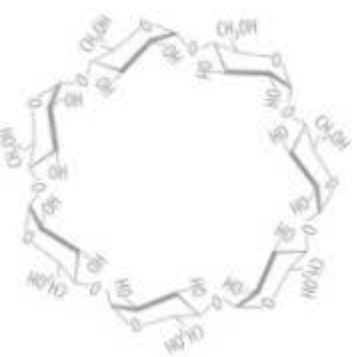
Se considerarmos que a Bioquímica de Alimentos é a ciência que visa a proporcionar alimentos de

alta qualidade, com respeito ao meio ambiente e com redução do custo de produção, é de fato perturbador que não houvesse até agora um texto em que fossem abordadas a teoria e a prática dessa ciência.

Foi com isso em mente que, ao planejar este livro, tive dois propósitos que se completam: preencher um hiato na literatura científica e contribuir para a difusão das boas práticas da Bioquímica de Alimentos.

Desejo que este trabalho cumpra, de fato, essa missão e seja útil para a boa formação acadêmica e para o aprimoramento dos profissionais aos quais o livro se destina. Se isso ocorrer, tanto eu como os colaboradores estaremos recompensados.

Maria Gabriella Bello Koblitz



Agradecimentos



Desejo agradecer
aos colaboradores deste livro,
aos meus professores,
aos alunos do curso de Engenharia de Alimentos da UEFS
e ao meu marido Flávio.

Sem eles este livro não teria se tornado realidade.

Maria Gabriella Bello Koblitz



Sumário



■ 1 Introdução, 7

Denise M. Pinheiro

- ▶ Identificação das enzimas, 7
- ▶ Mitos e fatos sobre as enzimas, 11
- ▶ Enzimas microbianas, 15
- ▶ Bibliografia, 17

■ 2 Carboidrases, 19

Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 20
- ▶ Características gerais e modo de ação, 20
- ▶ Amilases, 22
- ▶ Pectinases, 38
- ▶ Celulases e hemicelulases, 45
- ▶ Lactases, 55
- ▶ Invertases, 62
- ▶ Outras carboidrases de interesse em alimentos, 69
- ▶ Bibliografia, 74

■ 3 Proteases, 77

Luciana Ferracini dos Santos

Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 78
- ▶ Características gerais e modo de ação, 79
- ▶ Fontes e principais características, 81
- ▶ Aplicação industrial, 85
- ▶ Métodos de detecção da atividade, 103
- ▶ Bibliografia, 103

■ 4 Lipases, 107

Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 108
- ▶ Características gerais e modo de ação, 109
- ▶ Fontes e principais características, 113
- ▶ Importância em alimentos:
rancidez hidrolítica, 114
- ▶ Aplicação industrial, 115
- ▶ Outras aplicações, 121
- ▶ Métodos de detecção da atividade, 122
- ▶ Bibliografia, 123

■ 5 Oxidorredutases, 125

Severino Matias de Alencar

Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 126
- ▶ Polifenol-oxidases, 127
- ▶ Peroxidases, 136
- ▶ Lipoxigenases, 140
- ▶ Catalases, 143
- ▶ Glicose-oxidases (EC 1.1.3.4), 145
- ▶ Xantina-oxidases, 147
- ▶ Áscorbato-oxidases, 148
- ▶ Métodos de detecção da atividade, 149
- ▶ Bibliografia, 151

■ **6** Transformações Bioquímicas em Produtos Hortícolas após a Colheita, 153

Angelo Jacomino

Maria Cecília de Arruda

Ilana Urbano Bron

Ricardo Alfredo Kluge

- ▶ Introdução, 154
- ▶ Amadurecimento de produtos hortícolas: fatores de influência, 155
- ▶ Amadurecimento de produtos hortícolas: mudanças bioquímicas, 169
- ▶ Frutas e hortaliças minimamente processadas, 183
- ▶ Bibliografia, 187

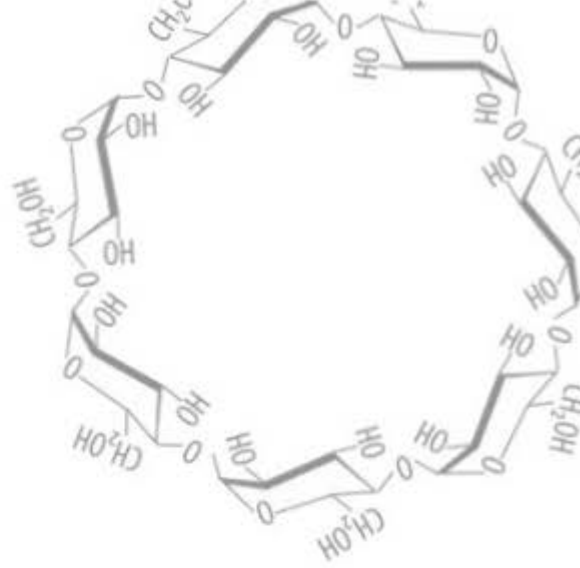
■ **7** Bioquímica da Carne: Bases Científicas e Implicações Tecnológicas, 191

Marco Antonio Trindade

Izael Gressoni Júnior

- ▶ Introdução, 192
- ▶ Composição, 193
- ▶ Mudanças bioquímicas pós-morte no músculo, 217
- ▶ Implicações tecnológicas, 222
- ▶ Bibliografia, 232

■ Índice Alfabético, 235



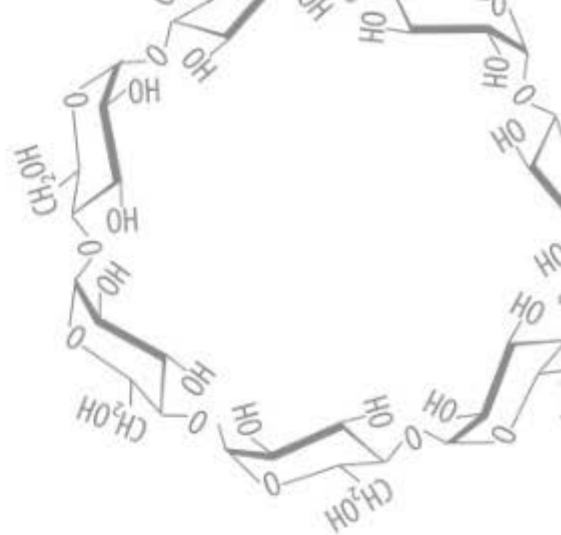
Bioquímica de Alimentos

Teoria e Aplicações Práticas



1

Introdução



Denise M. Pinheiro

- Identificação das enzimas, 7
- Mitos e fatos sobre as enzimas, 11
- Enzimas microbianas, 15
- Bibliografia, 17

A tecnologia enzimática é uma ferramenta interdisciplinar reconhecida pela Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) como um componente importante para o desenvolvimento industrial sustentável. Suas aplicações vão de processos industriais simples à descoberta de substâncias farmacêuticas e de seu respectivo desenvolvimento.

A Tabela 1.1 mostra uma série de exemplos recentes da ampla e crescente utilização de enzimas em vários setores industriais.

O rápido desenvolvimento da engenharia genética, das técnicas de *screening*, entre outras tecnologias emergentes, também tem aberto caminho para o crescimento de novas aplicações (Tabela 1.2).

O mercado de enzimas industriais é crescente e bastante promissor. Em 1998, o mercado mundial de enzimas era da ordem de 1,5 bilhão de dólares; 47% desse valor provinham do setor de alimentos e ração animal, 32%, do setor de detergentes, 11%, do setor têxtil e de couro,

A tecnologia enzimática pode ser considerada um importante componente do desenvolvimento industrial sustentável que vem crescendo com o rápido surgimento de tecnologias emergentes. O mercado de enzimas é crescente e promissor.

Tabela 1.1 Tecnologia enzimática nas indústrias; alguns exemplos (van Beilen e Li, 2002).

<i>Indústria</i>	<i>Item</i>
Agropecuária	Aditivos de ração
	Produção de enzimas heterólogas
Alimentos	Enzimas usadas na preparação de alimentos
	Nutracêuticos; ingredientes
Detergentes	Novas enzimas de detergentes
Energia	Álcool combustível; Biodiesel
Farmacêutica	Compostos quirais
	Engenharia de glicoproteínas
	Enzimas como alvo de substâncias farmacêuticas
Materiais	Papel
	Polímeros
	Tecidos
	Tratamento de couro
Química	Biocatálise
	Compostos orgânicos

Tabela 1.2 Impacto de novas aplicações da tecnologia enzimática
(van Beilen e Li, 2002).

<i>Tecnologia</i>	<i>Desenvolvimento</i>
Adaptação de tecnologias à nova legislação	Isômero único em produtos farmacêuticos
	Organismos modificados geneticamente
	Redução de lixo e da poluição ambiental
Biocatálise combinatória	Polimerização enzimática
	Glicosilação de compostos bioativos
Bioeletro-catálise	Biossensores, biorreatores e células de biocombustível
Determinação da estrutura protéica	Determinação estrutural e de localização de sítios ativo e alostéricos
Engenharia de bioprocessos	Resolução cinética dinâmica
	Biocatálise industrial
	Técnicas de proteção de grupos por processos enzimáticos
Engenharia enzimática	Evolução direta para aumentar a enantioseletividade
	Biocatálise
	Novas atividades enzimáticas por modificação química
	Enzimas artificiais
Engenharia metabólica	Metabólitos como substâncias químicas industriais
Genoma funcional	Descoberta de enzimas
	Genoma ligado à atividade enzimática
	Genoma de enzimas baseado na descoberta de substâncias ativas
Métodos de processamento	Descoberta de enzimas e aumento de sua atividade
	Enzimas imobilizadas
	Métodos de <i>screening</i>
	Análise global das atividades de proteínas
Produção e purificação de proteínas	Fermentação sólida contínua
	Purificação de proteínas
	Novos desenvolvimentos em biosseparação

Os principais consumidores de enzimas são as indústrias de alimentos e rações seguidas pelos setores de detergentes, têxtil, de papel e de produtos químicos. A maior parte dessas indústrias modifica biomoléculas que são substrato para diversas enzimas.

6%, do setor de papel e 4%, do setor de produtos químicos. Em 2002, o mercado de enzimas industriais chegou a 1,8 bilhão de dólares, um aumento de 17% em quatro anos (Figura 1.1).

Em 1997, o setor de alimentos e de ração animal faturava 705 milhões de dólares e, em 2002, havia crescido para 833 milhões. Observou-se um aumento de 128 milhões de dólares, portanto (Figura 1.1). A taxa de crescimento anual média, de 1997 a 2002, foi de 3,5% para o setor de alimentos e de ração animal, sendo as maiores taxas encontradas no setor das indústrias de detergentes (4,8%) e de papel (7,4%) (Figura 1.2).

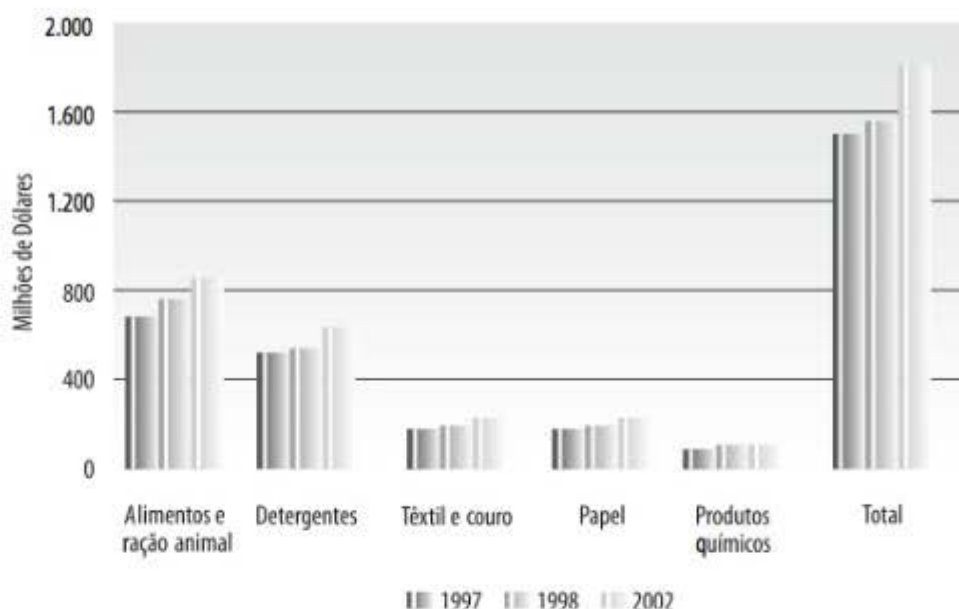


Figura 1.1 Mercado mundial de enzimas industriais, de 1997 a 2002.

É indubitável, como se vê, que o mercado de enzimas mostra-se mais promissor a cada ano. A empresa líder de produção e utilização de enzimas é a Novozymes, que deteve, em 2004, 44% do mercado (Figura 1.3).

No percentual de mercado que a Novozymes detém encontramos aplicações na indústria de detergentes (35%), alimentos (24%), ração animal (11%), microrganismos (5%) e outras enzimas (25%) (Figura 1.4).

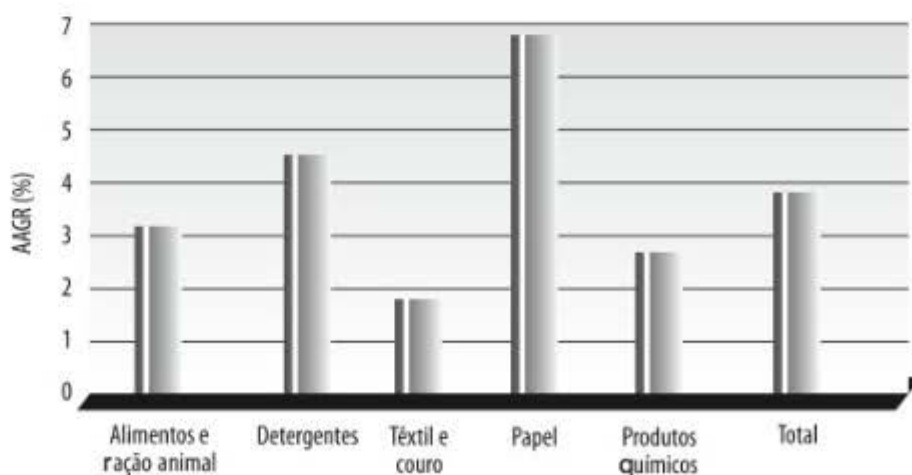


Figura 1.2 Taxas de crescimento anual média do mercado mundial de enzimas industriais.

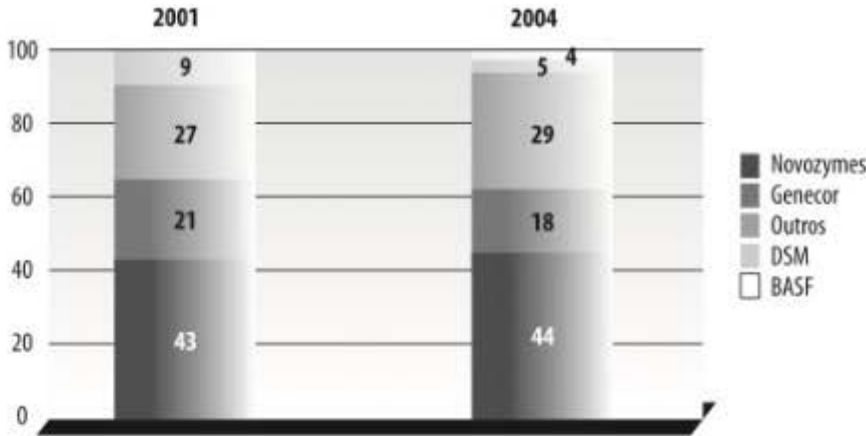


Figura 1.3 Mercado mundial de enzimas dos anos de 2001 e 2004 (Knudsen, 2004).

Enzimas, sendo catalisadores biológicos, atuam em condições de reação amenas e não-poluente, além de apresentarem altas especificidade e eficiência catalítica.

As indústrias de alimentos, de ração, de papel, de couro, têxtil e a agricultura são bem apropriadas à tecnologia enzimática, uma vez que os respectivos produtos consistem em biomoléculas, que são produzidas, degradadas ou modificadas por processos enzimáticos (Figura 1.5).

A utilização de enzimas na produção de alimentos envolve a seleção de enzimas apropriadas para converter o substrato em moléculas-alvo. Como exemplo, temos amido, celulose e lignocelulose, hemicelulose, glicanos, xilanos e pectinas (Figura 1.5A). Além dos polissacarídeos (carboidratos), encontramos também as proteínas e os lipídeos (Figura 1.5B).

As enzimas são catalisadores biológicos e apresentam características extremamente importantes, como:

- atuam em condições amenas de reação (temperatura ambiente, pressão atmosférica e pH neutro);

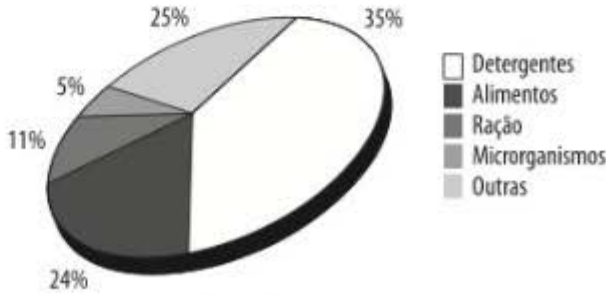


Figura 1.4 Distribuição das vendas da Novozymes.

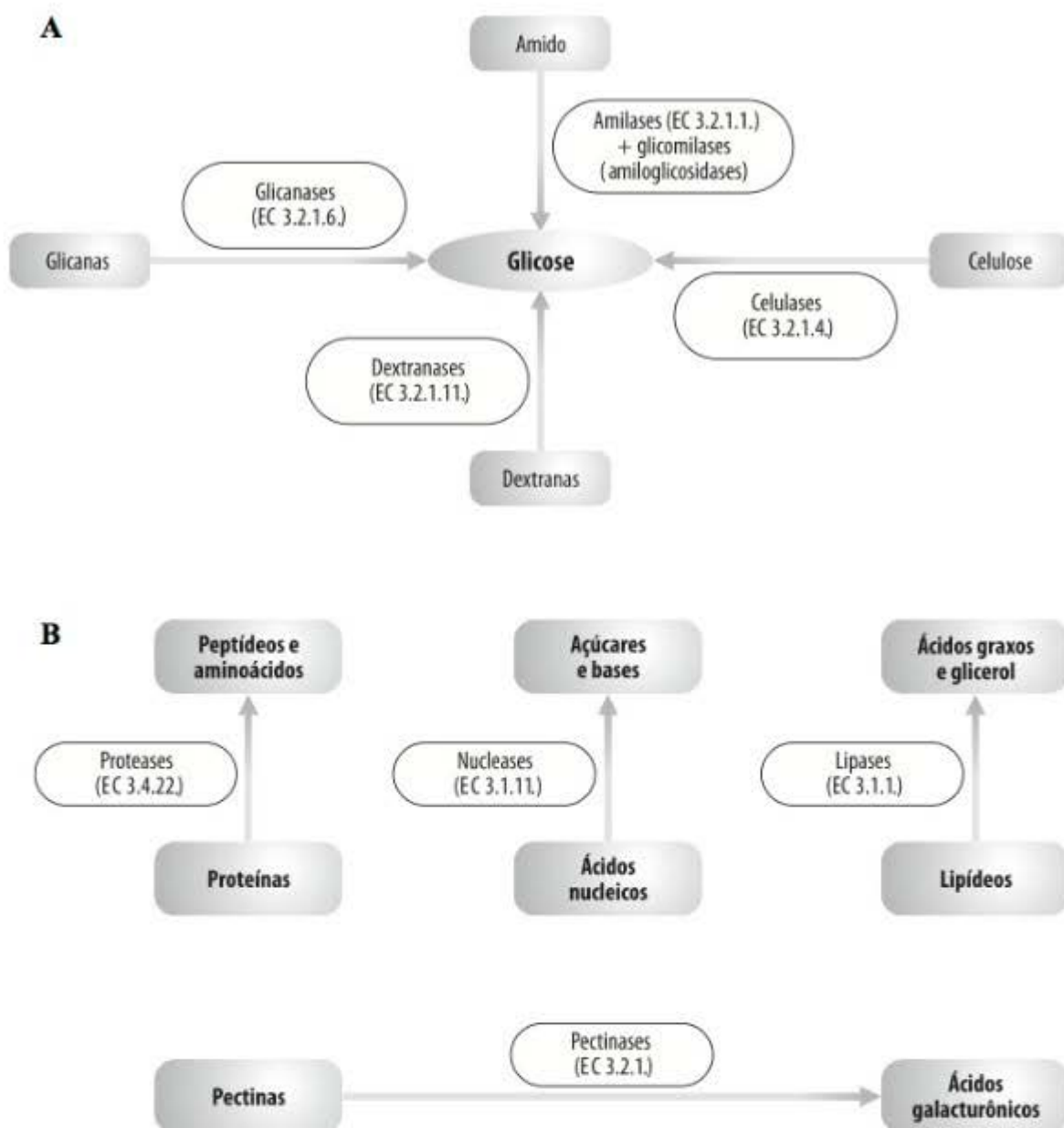


Figura 1.5 Macromoléculas hidrolisadas por enzimas utilizadas na indústria de alimentos: (A) polissacarídeos (carboidratos); (B) proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Wiseman *et al.*, 1998).

- são altamente específicas (regiosseletividade, seletividade de substrato, seletividade de grupo funcional e estereosseletividade);
- proporcionam um ambiente reacional não-agressivo ao meio ambiente (enzimas são biodegradáveis);
- apresentam alta eficiência catalítica.

Essas características são importantes quando comparadas aos métodos químicos de síntese orgânica e em

processos industriais. Levando-se em consideração essas características, não é surpreendente que a quantidade de aplicações comerciais de enzimas venha crescendo a cada ano. A Tabela 1.3 mostra algumas enzimas microbianas e suas respectivas aplicações em alimentos.

Segundo Faber (2000), aproximadamente 3.000 enzimas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica, mas há cerca de 25.000 enzimas na natureza. Portanto 90% das enzimas ainda nem mesmo foram descobertas.

► Identificação das enzimas

A Enzyme Commission (EC) propôs uma identificação para cada enzima. Nesse sistema, devem ser colocados dígitos (A, B, C e D) após o símbolo da Comissão (EC) (Faber, 2000):

- A: representa o tipo de reação;
- B: significa o subtipo, indicando o tipo de substrato ou molécula a ser transferida;
- C: indica a natureza do co-substrato;
- D: é o número individual da enzima.


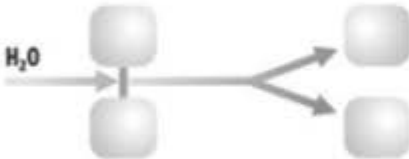
As enzimas são classificadas em seis categorias mostradas na Tabela 1.4 com suas respectivas disponibilidade e grau de utilização atuais.

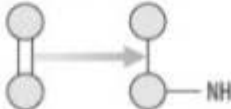
Entre todas as classes de enzimas, podemos observar que as hidrolases são aquelas que têm maior percentual de pesquisa (65%) e de utilização (+++). Essas enzimas têm aplicação em hidrólise de polissacarídeos, nitrilas, proteínas ou esterificação de ácidos graxos, entre outras. Elas são usadas industrialmente para degradar proteínas, carboidratos e lipídeos, em formulações de detergentes e na indústria de alimentos.

Em termos de utilização, observamos que as oxidoreduktases apresentam o mesmo nível que as hidrolases porque as reações de redução podem levar a produtos quirais a partir de substratos pró-quirais; e as reações de

As enzimas são classificadas em seis categorias, de acordo com a reação que catalisam. As que apresentam maior aplicação industrial são as hidrolases (EC 3.) seguidas pelas oxidoreduktases (EC 1.).

Tabela 1.3 Enzimas microbianas: classificação, ação, origem e aplicação em alimentos (Belitz e Grosch, 1999; Faber, 2000).

EC	Enzima	Origem biológica	Aplicação
Oxidoreductase		Ação enzimática: redução-oxidação – oxigenação de ligações de C-H, C-C, C=C; remoção total ou adição de equivalentes de átomos de hidrogênio	
1.1.3.4	Glicose-oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Remoção de glicose da clara do ovo e do ovo inteiro
1.11.1.6	Catalase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Micrococcus lysodeicticus</i>	
Hidrolases		Ação enzimática: hidrólise/síntese – formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, glicosídeos, organo-haletos	
3.1.1.1	Carboxil-esterase	<i>Rhizomucor miehei</i>	Panificação; obtenção de lipídeos estruturados e substituintes de gordura; produção de surfactantes; produção de aromas. Maturação de queijos. Produção de margarina livre de gordura trans
3.1.1.3	Triacilglicerol-lipase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>Candida lipolytica</i> ; <i>Mucor javanicus</i> ; <i>R. miehei</i> ; <i>Rhizopus arrhizus</i> ; <i>R. niveus</i>	
3.1.1.20	Tanase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i>	Remoção de adstringência em produtos vegetais (vinhos e sucos)
3.2.1.1	α -amilase	<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>Rhizopus delemar</i> ; <i>R. oryzae</i>	Modificação do amido; obtenção de xaropes de glicose e maltose; panificação; produção de bebidas alcoólicas (cerveja, saquê, vodka etc.)
3.2.1.2	β -amilase	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>B. megatherium</i> ; <i>B. subtilis</i>	
3.2.1.3	Glicoamilase	<i>A. oryzae</i> ; <i>Rhizopus arrhizus</i> ; <i>R. delemar</i> ; <i>R. oryzae</i> ; <i>Sporotrichum dimorphosporum</i>	
3.2.1.68	Isoamilase	<i>Bacillus cereus</i>	
3.2.1.41	Pululanase	<i>Bacillus acidopullulyticus</i> ; <i>Klebsiella aerogenes</i>	

3.1.1.11	Pectinesterase	<i>Aspergillus niger</i>	Extração e clarificação de sucos, óleos e gorduras vegetais; remoção de polpa de cacau e café; vinhos
3.2.1.15	Poligalacturonase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Penicillium simplicissimum</i> ; <i>Trichoderma reesei</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i>	
3.2.1.4	Celulase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Rhizopus delemar</i> ; <i>R. oryzae</i> ; <i>Sporotrichum dimorphosporum</i> ; <i>Thielavia terrestris</i> ; <i>Trichoderma reesei</i>	
3.2.1.32	Xilanase	<i>Streptomyces</i> sp.; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Sporotrichum dimorphosporum</i>	
3.2.1.7	Inulinase	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Produção de frutoligossacarídeos; substituintes de gordura
3.2.1.11	Dextranase	<i>Klebsiella aerogenes</i> ; <i>Penicillium funiculosum</i> ; <i>P. lum</i>	Cristalização e aumento do rendimento de sacarose de cana
3.2.1.20	α -glicosidase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i>	Síntese de açúcares não-convencionais; desglicosilação de flavonóides
3.2.1.21	β -glicosidase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Trichoderma reesei</i>	
3.2.1.23	β -galactosidase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>Kluyveromyces fragilis</i> ; <i>K. lactis</i>	Produtos lácteos com baixo teor de lactose; produção de galactoligossacarídeos
3.2.1.26	β -frutofuranosidase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ; <i>S. cerevisiae</i>	Produção de açúcar invertido, frutoligossacarídeos; recheios e coberturas doces
3.4.21.62-67	Serina-proteinase microbiana	<i>Bacillus licheniformis</i>	Panificação; obtenção de hidrolisado protéico (flavorizante); produção e maturação de queijos; clarificação de cerveja
3.4.23.18-30	Carboxil-proteinase microbiana	<i>Aspergillus melleus</i> ; <i>Endothia parasitica</i> ; <i>Rhizomucor miehei</i> ; <i>Mucor pusillus</i> ; <i>A. oryzae</i>	
3.4.24.25-40	Metalo-proteinase microbiana	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>B. subtilis</i>	
Liases		Ação enzimática: adição-eliminação de pequenas moléculas nas ligações C=C, C=N, C=O	
4.2.2.10	Pectina-liase	<i>Aspergillus niger</i>	Extração e clarificação de sucos, óleos e gorduras vegetais; vinhos

(continua)

Tabela 1.3 Enzimas microbianas: classificação, ação, origem e aplicação em alimentos (Belitz e Grosch, 1999; Faber, 2000). (continuação)

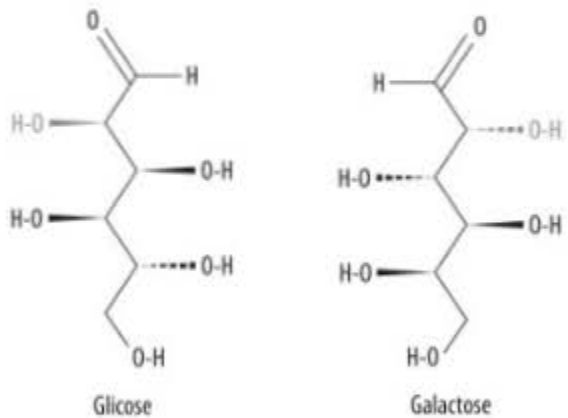
EC	Enzima	Origem biológica	Aplicação
Isomerases	 <p>Glicose</p> <p>Galactose</p>	Ação enzimática: isomerização – racemização, epimerização, rearranjos	
5.3.1.5	Xilose-isomerase	<i>Actinoplanes missouriensis</i> ; <i>Arthrobacter</i> sp.; <i>Bacillus coagulans</i> ; <i>Streptomyces albus</i> ; <i>S. olivaceus</i> ; <i>S. olivovhromogenes</i> ; <i>S. rubiginosus</i>	Obtenção de xarope de frutose (HFCS)

Tabela 1.4 Quantidade de enzimas classificadas, disponíveis e sua respectiva utilidade.

Classe de enzimas	Quantidade		Utilidade*
	Classificadas	Disponíveis	
1. Oxidorredutase	650	90	+++ / 25%
2. Transferase	720	90	+ / cerca de 5%
3. Hidrolase	636	150	+++ / 65%
4. Liase	255	35	++ / cerca de 5%
5. Isomerase	120	6	± / cerca de 1%
6. Ligase	80	5	± / cerca de 1%

* +++ muito utilizada a ± pouco usada; (%) percentual de pesquisa com cada enzima no período de 1987 a 1999 (Faber, 2000)

oxidação levam à introdução de grupos funcionais em moléculas, como alcanos, alcenos ou aromáticos, sem a utilização de materiais tóxicos empregados na síntese orgânica e que são problemáticos para o tratamento de rejeitos.

► Mitos e fatos sobre as enzimas

Segundo Rozzell (1999), mesmo com todas as características importantes, citadas anteriormente, as enzimas são ainda subutilizadas como tecnologia. Biocatalisadores não são ainda considerados métodos viáveis por químicos sintéticos. Muito freqüentemente a rota enzimática é dada em última alternativa quando todas as alternativas químicas falharam. Idéias preconcebidas e mal-entendidos continuam a limitar a utilização de enzimas pelas indústrias. Iremos examinar cinco dessas idéias preconcebidas mais comuns, que são os mitos relacionados aos catalisadores enzimáticos.

► Os cinco equívocos mais comuns

Preço alto

O primeiro grande mito assevera que as enzimas são de alto custo. O fato aqui a ser considerado deve ser a relação custo-contribuição da enzima ao processo. Por

Tabela 1.5 Preços de algumas enzimas e de catalisadores químicos (Rozzell, 1999).

Enzima	≈ Preço em US\$/kg	Catalisador	≈ Preço em US\$/kg
Lactato-desidrogenase	100.000	BINAP	40.000
Esterase de fígado de porco	15.000	ChiraPhos	10.000
Penicilina-amidase	10.000	Platina	12.000
Aspartase	10.000	Pd(Diphos) ₂	5.000
Tripsina	5.000	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	2.000
Lipase	5.000	Jacobsen	1.000
Glicose-isomerase	500	Chirald	500
Protease de detergente	250	Nickel de Raney	30
Glicoamilase	100		

A aplicação de enzimas muitas vezes esbarra em preconceitos: enzimas são consideradas caras, de baixa estabilidade e produtividade, dependentes de co-fatores de difícil regeneração, além de baixo potencial para aplicação industrial. No entanto, na prática, diversos processos lucrativos vêm desmentindo esses equívocos.

exemplo, para o uso da aspartase na produção de ácido aspártico, observamos que o custo-contribuição da enzima é menor do que US\$ 0,10 por kg. Se compararmos ainda com o preço dos catalisadores químicos, os preços das enzimas não são muito diferentes dos preços dos primeiros (Tabela 1.5).

Instabilidade

O segundo grande mito estabelece que as enzimas são muito instáveis. Nesse ponto, Rozzell (1999) questiona “Instável a quê? A altas temperaturas e a valores de pH extremos?” Sabe-se que soluções enzimáticas podem perder atividade em temperatura ambiente. Entretanto o aspecto de estabilidade deve ser avaliado sob condições operacionais para um processo desejado.

A Tabela 1.6 lista os tempos de meia-vida para biocatalisadores imobilizados sob condições operacionais de utilização. Esses biocatalisadores têm demonstrado suficiente estabilidade para *scale-up* e comercialização.

Baixa produtividade

O terceiro grande mito refere-se à baixa produtividade. Essa frase é bastante comentada em toda a literatura

Tabela 1.6 Tempo de meia-vida de biocatalisadores em condições operacionais (Rozzell, 1999).

<i>Biocatalisador</i>	<i>Tempo de meia-vida</i>
Aspartase	6 meses a 2 anos
Penicilina-amidase	> 6 meses
Isomaltulose-sintase	358 dias
Urocanase	180 dias
Fumarase	180 dias
Arginina-desaminase	140 dias
Transaminase	90 dias
Lactase	90 dias
Protease	> 60 dias

correlata. Podemos encontrar processos de alta produtividade, que incluem:

- a produção de ácido aspártico, pela aspartase imobilizada;
- a produção de L-fenilalanina, usando amidase ou transaminase;
- a produção de L-ter-leucina, usando leucina-desidrogenase em reator de membrana;
- a produção de ácido 2-cloropropiônico, usando esterificação por lipase;
- a produção de 1-feniletilamina pela acilação estereosseletiva por lipase.

Dependência de co-fatores

O quarto grande mito afirma que os co-fatores redox não podem ser reciclados eficientemente. Em uma primeira metodologia, podemos utilizar reações acopladas; como, por exemplo, a produção do ácido fenil-lático por meio da redução seletiva de fenil-piruvato, usando-se NADH e uma desidrogenase. O NADH necessário para a reação é regenerado, usando-se desidrogenase e etanol. Os ciclos permitidos foram da ordem de aproximada-

Tabela 1.7 Produtos industrializados que utilizam biocatalisadores.

<i>Produto</i>	<i>Mercado mundial (US\$ milhões)</i>
Óleos/ácidos graxos/triglicerídeos	1.000
Xarope de milho com alto conteúdo de frutose	1.000
Aspartame	800
Acrilamida	300
6-APA/7-ADCA	200
Aminoácidos	150
Ácido S-2-cloropropiônico	10
Ciclodextrina	10

mente 2.000 vezes, e o etanol é um agente redutor de baixo custo, levando a um processo econômico.

Baixa potencial de aplicação industrial

O quinto e último grande mito assegura que as enzimas não catalisam reações de interesse industrial. De acordo com as Tabelas 1.7 e 1.8, essa assertiva não fica evidente, pois existem diversos processos biocatalíticos que têm sido comercializados com sucesso. Dentre esses processos, podemos citar o processo da Tanabe Seiyaku Co. Ltd., no Japão, que utiliza desde 1954 a aminoacilase para produção de L-aminoácidos (Tabela 1.8).

Tabela 1.8 Aplicações industriais de enzimas isoladas (Liese *et al.*, 2000).

<i>Produto</i>	<i>Biocatalisador</i>	<i>Em operação desde</i>	<i>Empresa</i>
L-aminoácido	Aminoacilase	1954, 1969	Tanabe Seiyaku Co. Ltd., Japão
Ácido 6-aminopenicilânico	Penicilina-acilase	1973	SANMProgetti e outros
Leite com baixa lactose	Lactase	1977	Central del Latte, Milão, Itália (SANMProgetti Technology)
Ácido 7-cefalosporânico	D-aminoácido oxidase	1979	Toyo Jozo e Asahi Chemical Industry, Japão

Todos os mitos contra as enzimas, portanto, podem ser ultrapassados. Podem-se utilizar ainda ferramentas de *screening* de novos e específicos biocatalisadores, explorando a biodiversidade existente, principalmente em países como o Brasil que apresentam um extenso território e grande riqueza natural.

► Enzimas microbianas

Os microrganismos são hoje os principais responsáveis pelos avanços da biotecnologia moderna, produzindo diversas biomoléculas de interesse, entre elas as enzimas. A diversidade de microrganismos e as técnicas de seleção de organismos produtores de enzimas proporcionam novas aplicações para processos industriais emergentes.

Os microrganismos e os invertebrados constituem aproximadamente 90% das espécies da Terra e desempenham um papel fundamental no funcionamento de ecossistemas. Embora, sejam conhecidos 80% das plantas e mais de 90% dos vertebrados existentes na Natureza, conhecemos menos de 1% das bactérias e vírus e menos de 5% dos fungos. Conhecemos menos de 5.000 espécies bacterianas embora estime-se que existam de 100.000 a mais de 1 milhão. Segundo Pelczar *et al.* (1993), existem no solo, aproximadamente, 3 milhões a 500 milhões de bactérias; 1 milhão a 20 milhões de actinomicetos; 5 mil a 900 mil fungos; e de mil a 100 mil leveduras.

Segundo Dias (2003), o Brasil é o país com maior biodiversidade do planeta, com aproximadamente 10 a 20% do total de espécies de microrganismos da Terra. O mesmo autor relata que a biodiversidade brasileira ainda não é conhecida totalmente em virtude de sua grande complexidade, que está diretamente relacionada às dimensões continentais do país e de sua enorme plataforma marinha. Mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos estão sob a jurisdição brasileira.

Os microrganismos caracterizados, existentes no planeta, são os responsáveis pelos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura, como consequência das descobertas nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos. A participação dos produtos obtidos a partir das atividades microbianas no mercado global pode atingir US\$ 40 bilhões ao ano, sendo essa exploração ainda incipiente.

Os microrganismos apresentam potencial de utilização para obtenção de produtos biotecnológicos, como: produção de antibióticos (estreptomicina, penicilina), produção de alimentos (cogumelos), processamento de alimentos (queijo, iogurte, vinagre), bebidas alcoólicas (vinho, cerveja), ácidos orgânicos (cítrico, fumárico), alcoóis (etanol, metanol), tratamento e/ou remediação de resíduos (esgoto doméstico, lixo); fertilização de solos (fixação biológica de nitrogênio) e controle biológico de pragas e doenças (controle da lagarta da soja, da cigarrinha da cana-de-açúcar); e produção de

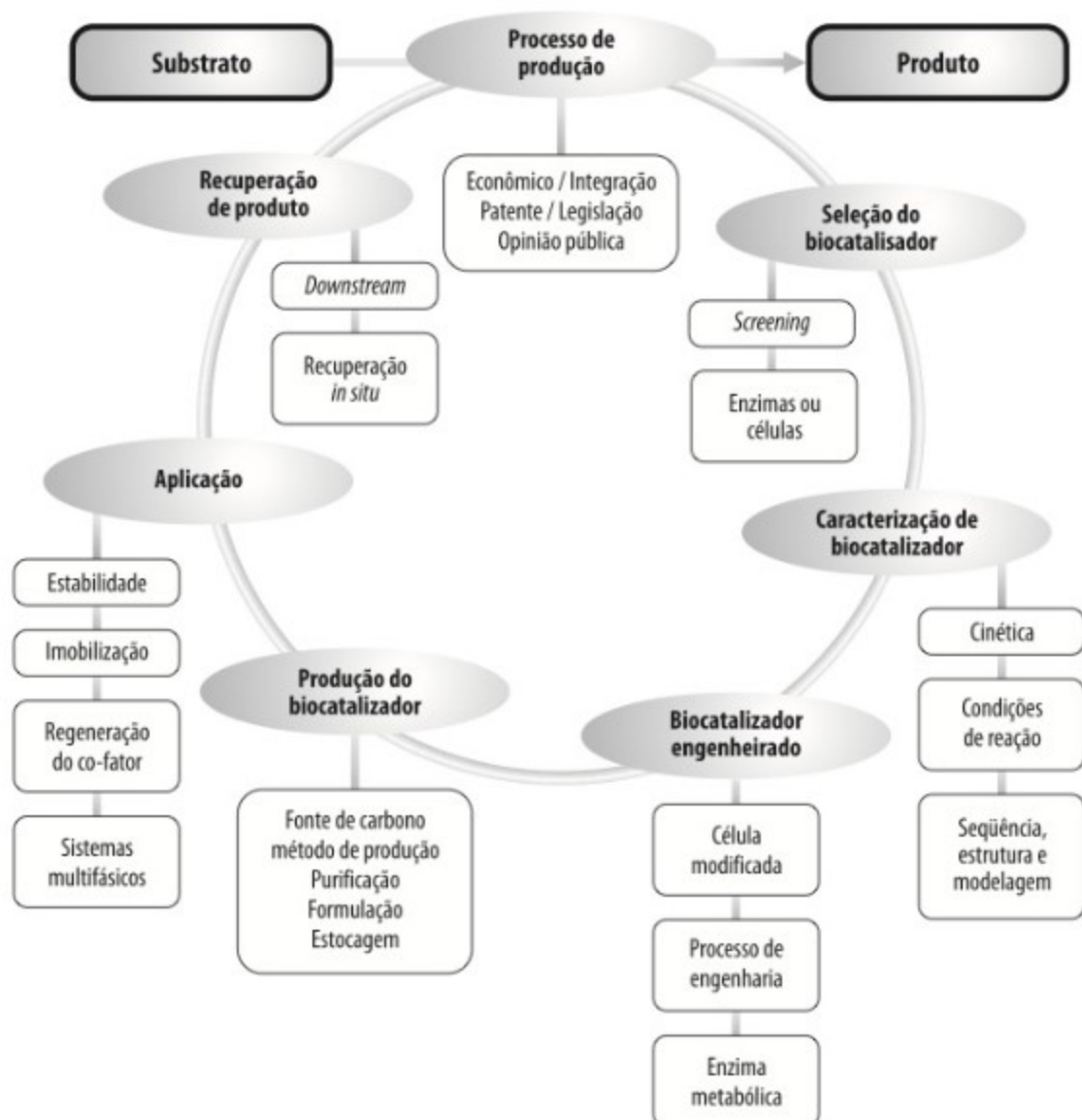


Figura 1.6 Ciclo do biocatalisador (Schmid *et al.*, 2001; van Beilen e Li, 2002).

compostos de aromas (anisaldeído, álcool 2-fenil-etanol, coumarinas, benzaldeído).

Schmid *et al.* (2001) focalizam empresas, como BASF, DSM e LONZA, que objetivam substituir processos químicos por biotecnológicos, utilizando enzimas ou microrganismos. Essa utilização de processos biotecnológicos confronta-se com um fator preponderante, que é o custo do processo. Dessa maneira, essas empresas precisam adequar os seus processos industriais à utilização de enzimas ou microrganismos que apresentem rendimentos altos e a produtos de fácil recuperação, aliados ainda à redução de custos. Essa adequação a um processo novo pode ser monitorada pelo ciclo do biocatalisador (Figura 1.6).

O mercado de enzimas e a quantidade de processos com tecnologia enzimática vêm crescendo rapidamente pelos baixos custos dos métodos de produção, novas áreas de aplicação e novas enzimas. A possibilidade de mudanças nas propriedades das enzimas e nos métodos de seleção (*screening*) de enzimas com características diferentes das já encontradas fazem com que esses biocatalisadores sejam alvos de aplicações para processos industriais emergentes.

► Bibliografia

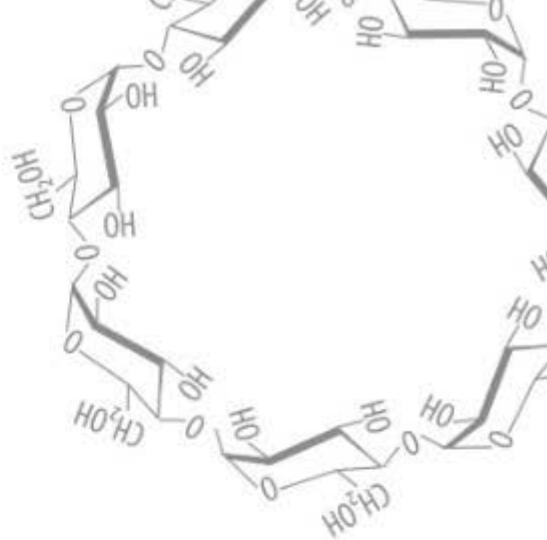
- Belitz, H.-D.; Grosch, W. *Enzymes*. In: Food Chemistry, p. 92-151. Springer-Verlag, Berlim. 1999.
- Berger, R.G. *Aroma Biotechnology*. 240 p. Springer-Verlag, Berlim. 1995.
- Canhos, V.P. Estratégia Nacional de Diversidade Biológica — Microrganismos e Biodiversidade de Solos, <http://www.bdt.fat.org.br/publicações/politica/gtt/gtt10>, 26/01/2003, 35 pp.
- Dias, B.F.S. Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas — A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: Desafios e Oportunidades, <http://www.bdt.fat.org.br/publicações/padct/bio/cap1/bráulio.html>, 26/01/2003.
- Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: a textbook*, 453 p. Springer-Verlag, Berlim. 2000.
- Knudsen, M.S. *The Zymes*. Novozyme's Shareholder Magazine, no. 2, September. 2004.

Leitura recomendada: Belitz & Grosch, 1999; Rozzell, 1999; van Beilen & Li, 2002.

- Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*. 422 p. Wiley-VCH Verlag GmbH. 2000.
- Novozymes, Report 2003, http://www.novozymes.com/library/downloads/ar2003/Beretning_UK.pdf, 06/02/2005, 44 p.
- Olsen, H. S. *Enzymes at work*. www.novozymes.com, 1/10/2004.
- Pelczar, M.J.Jr.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. *Microbiology: concepts and applications*. 896 p. McGraw-Hill, Inc. EUA. 1993.
- Rozzell, J.D. *Commercial scale biocatalysis: myths and realities*. *Bio-organic & Medicinal Chemistry*, 7: 2253-2261. 1999.
- Schmid, A.; Dordick, J.S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.E., Witholt, B. *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. *Nature*, 109: 258-268. 2001.
- Staley, J. Sistema de informação sobre biodiversidade/biotecnologia para o desenvolvimento sustentável — A Diversidade Microbiológica e a Biosfera, <http://www.bdt.fat.org.br/oca/sib/staley>, 26/01/2003, 8 pp.
- van Beilen, J.B.; Li, Z. *Enzyme technology: an overview*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:338-344. 2002.
- Wiseman, A.; Ridgway, T.; Wiseman, H. *Added enzymes in the food industry*. In: Suckling, C. J.; Gibson, C. L.; Pitt, A.R. *Enzyme chemistry: impact and applications*, p. 216-248. Blackie Academic & Professional. 1998.

2

Carboidrases



Maria Gabriela Bello Koblitz

- Introdução, 20
- Características gerais e modo de ação, 20
- Amilases, 22
- Pectinases, 38
- Celulases e hemicelulases, 45
- Lactases, 55
- Invertases, 62
- Outras carboidrases de interesse em alimentos, 69
- Bibliografia, 74

► Introdução

Carboidrases são as enzimas que catalisam a degradação de carboidratos; isto é, hidrolisam as ligações glicosídicas entre monossacarídeos formadores de oligossacarídeos e/ou polissacarídeos. Como todas as hidrolases, as carboidrases são também capazes de catalisar a reação inversa da hidrólise, sintetizando oligossacarídeos em condições de reação especiais, que envolvem baixa atividade de água e excesso de substrato. Além disso, carboidrases catalisam ainda reações de transglicosilação, hidrolisando ligações glicosídicas e transferindo o resíduo liberado para outro aceptor, diferente da água.

► Características gerais e modo de ação

► Clivagem da ligação glicosídica

Em geral, carboidrases são específicas quanto ao resíduo que será transferido para a água; isto é, o tipo de monossacarídeo ao qual a enzima é capaz de se ligar para efetuar a reação de hidrólise. Assim, glicosidases, galactosidases e frutofuranosidases são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas que envolvem glicoses, galactoses e frutoses, respectivamente. Normalmente, a aglicona (molécula à qual está ligado o resíduo a ser hidrolisado) não é importante para a eficiência da catálise. No entanto, quando a aglicona é também constituída de carboidratos (no caso dos oligo- e dos polissacarídeos), a posição da ligação que os une torna-se um fator a considerar.

► Posição da ligação à aglicona

Quando a aglicona é uma pentose, uma hexose ou seus polímeros, a posição da ligação do resíduo determina a habilidade, ou não, de uma dada enzima de hidrolisar a ligação. Assim, enzimas capazes de hidrolisar, satisfatoriamente, ligações α -1,4 entre duas hexoses podem ser totalmente inúteis na hidrólise de ligações α -1,6 entre as mesmas hexoses.

Carboidrases são as enzimas que hidrolisam as ligações entre monossacarídeos sendo também capazes de catalisar a reação inversa da hidrólise e reações de transglicosilação. São específicas com relação ao tipo de monossacarídeo envolvido na ligação, a posição da ligação do resíduo, a configuração (α ou β) e a massa molecular do substrato.

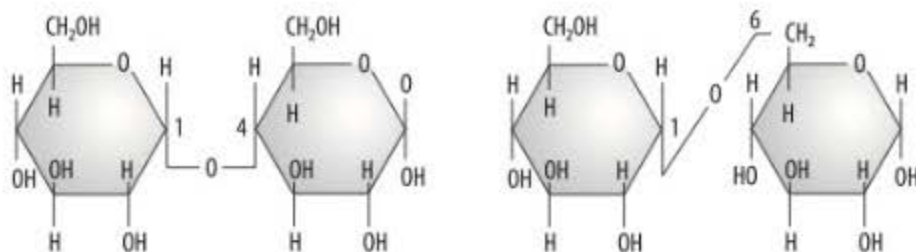


Figura 2.1 Ligações α -1,4 e α -1,6 entre unidades de glicose (maltose e isomaltose).

► Configurações do substrato

A maior parte dos carboidratos naturais são constituídos de resíduos do tipo D-sacarídeos (e não do tipo L). Em consequência, as enzimas envolvidas em sua hidrólise são específicas para esse tipo de configuração.

O carbono 1 de monossacarídeos pode apresentar-se nas configurações α ou β . Dependendo da configuração, serão estabelecidas diferentes ligações glicosídicas para as quais as carboidrases são altamente específicas. Assim, α -glicosidases são capazes de hidrolisar ligações α -glicosídicas, porém não são capazes de promover a clivagem de ligações β -glicosídicas.

Uma vez que a ligação seja rompida, o resíduo liberado poderá manter sua configuração (α ou β) ou sofrer inversão da configuração, dependendo da enzima envolvida na reação.

► Tamanho da molécula do substrato

Algumas carboidrases apresentam alta atividade sobre substratos poliméricos. A medida que a massa molecular do substrato é reduzida, diminui a atividade dessas enzi-

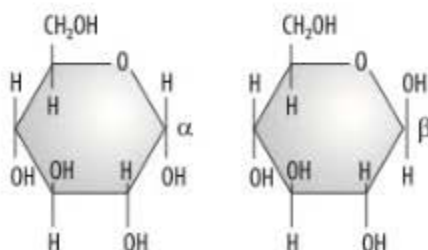


Figura 2.2 Representações de Haworth para α -D-glicopirranose e β -D-glicopirranose.

mas sobre eles. De forma similar, certas enzimas apresentam atividade apenas sobre pequenos oligossacarídeos, não sendo capazes de hidrolisar moléculas idênticas, porém de maior massa molecular.

► Padrões endo- e exo- de atividade

Algumas carboidrases (exoenzimas) atacam seus substratos de forma ordenada, a partir da extremidade (em geral, a extremidade não-redutora). Sua atividade pode ser relacionada com a rápida liberação de açúcares redutores e com pequena alteração na viscosidade do meio reacional, a curto prazo.

Outras carboidrases hidrolisam o substrato de forma aleatória, clivando ligações no interior do polímero. Essas são conhecidas como endoenzimas e sua atividade pode ser relacionada com a rápida perda de viscosidade da solução, acompanhada de pequena liberação de açúcares redutores (Figuras 2.3 e 2.5).

As principais carboidrases de aplicação em alimentos são descritas a seguir.

► Amilases

São as carboidrases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas α -1,4 e/ou α -1,6 presentes no amido, no glicogênio e nos sacarídeos derivados. Existe uma variedade de enzimas que correspondem a essa definição (Tabela 2.1) e que podem ser agrupadas de acordo com diferentes características: modo de ação (endo- ou exo-), retenção ou inversão de configuração (α ou β), afinidade

Exoenzimas atacam os substratos de forma ordenada, a partir da extremidade, gerando açúcares redutores e endoenzimas hidrolisam ligações de forma aleatória reduzindo a viscosidade da solução.

Amilases são as carboidrases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas α -1,4 e/ou α -1,6 presentes no amido, glicogênio e sacarídeos derivados.

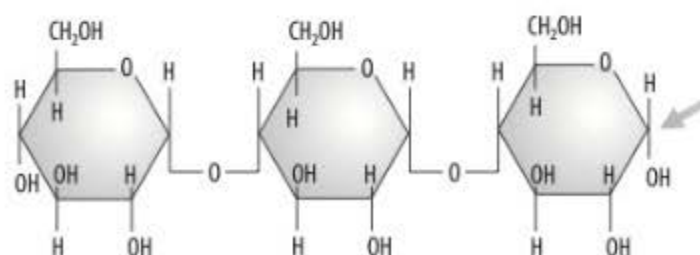


Figura 2.3 Extremidade redutora da maltotriose.

por ligações do tipo α -1,4 ou do tipo α -1,6, atividade de transglicosilação ou não.

Devido à sua importância para a indústria de alimentos, serão discutidas aqui, em maiores detalhes, α -amilases, β -amilases, glicoamilases e algumas enzimas desramificantes.

► Substrato

O amido é um polissacarídeo constituído de centenas ou milhares de unidades de glicose. É o principal material de reserva das plantas (em sementes, tubérculos, raízes, bulbos e rizomas) e a principal fonte de energia

Tabela 2.1 Enzimas que agem sobre amido e glicogênio; alguns exemplos (Whitaker, 1994).

Enzima	Ligação preferencial para hidrólise	Substrato preferencial	Resultado da hidrólise
<i>Endoenzimas</i>			
α -amilase EC 3.2.1.1.	α -1,4	Amido	Dextrinas, maltose
Isoamilase EC 3.2.1.68.	α -1,6	Amilopectina	Amilose (dextrinas lineares)
Isomaltase EC 3.2.1.10.	α -1,6	Dextrinas-limite	Maltose, maltotriose
Ciclomaltodextrinase EC 3.2.1.54.	α -1,4	Ciclodextrinas e dextrinas lineares	Maltose, maltotriose
Pululanase EC 3.2.1.41.	α -1,6	Pululana e amilopectina	Maltotrioses e dextrinas lineares
Isopululanase EC 3.2.1.57.	α -1,4	Pululana	Isopanose
<i>Exoenzimas</i>			
β -amilase EC 3.2.1.2.	α -1,4	Amido	β -maltoses, dextrinas
Glicoamilase EC 3.2.1.3.	α -1,4, α -1,6	Amido	β -glicosés
α -glicosidase EC 3.2.1.20.	α -1,4	Diversos	α -glicosés
Ciclomaltodextrina-glucano-transferase EC 2.4.1.19.	α -1,4	Amido	Ciclodextrinas

da nutrição animal. Em alimentos, o amido é o principal constituinte de uma grande variedade de produtos, sendo responsável por sua estrutura, textura e/ou consistência. Nos vegetais, o amido encontra-se em pequenos grânulos, de características peculiares a cada espécie, contendo as duas frações que o constituem: amilose (de 15 a 30%) e amilopectina (de 85 a 70%).

A amilose é um polímero linear, formado por unidades de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 2.1). Em solução, a amilose apresenta conformação helicoidal e tem a propriedade de formar um complexo de cor azul-escura com o iodo.

A amilopectina é um polímero ramificado, formado por cadeias de glicose semelhantes à amilose, que são unidas entre si por ligações do tipo α -1,6 (Figura 2.1).

Em seu estado nativo, grânulos de amido são resistentes à ação da maior parte das enzimas amilolíticas. No entanto, quando aquecidos em água até uma dada temperatura (característica para cada tipo de grânulo), os grânulos absorvem grande quantidade de água, sofrendo gelatinização e tornando-se suscetíveis à hidrólise enzimática.

O glicogênio é um polímero de glicoses, produzido e armazenado por animais (principalmente no fígado e nos músculos). Sua estrutura assemelha-se à da amilopectina, sendo, porém, mais ramificado (apresenta maior número de ligações α -1,6).

A amilose é um polímero linear, formado por unidades de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina é um polímero ramificado formado por cadeias de glicose unidas entre si por ligações α -1,6. O glicogênio é um polímero de glicoses produzido por animais semelhante à amilopectina, porém, mais ramificado.

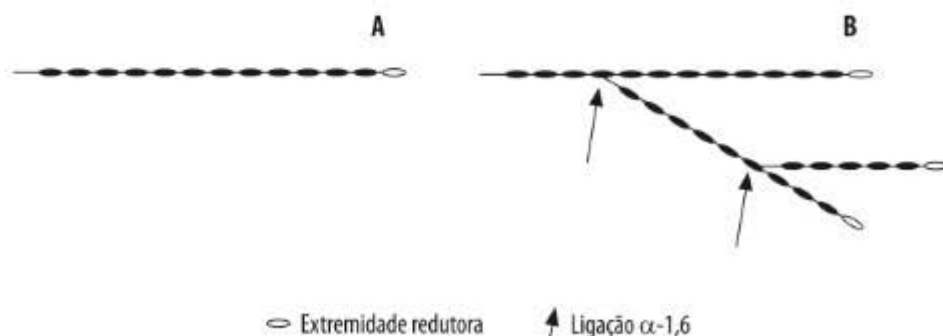


Figura 2.4 Representações esquemáticas da amilose (A) e da amilopectina (B).

► Fontes e principais características

α -amilases

As α -amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas largamente distribuídas na Natureza, produzidas por animais (na saliva; no pâncreas), vegetais (principalmente em sementes amiláceas, especialmente durante a germinação) e microrganismos (por bactérias e fungos filamentosos, mas não por leveduras alcoólicas). As α -amilases são endocarbohidrases que hidrolisam ligações α -1,4, existentes na amilose e na amilopectina de forma aleatória, na porção central das moléculas.

Inicialmente, a ação dessas enzimas sobre o amido é rápida, uma vez que elas apresentam muito maior atividade sobre substratos de alta massa molecular, gerando uma mistura de oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares, chamada dextrina ou maltodextrina. Em maiores tempos de reação, α -amilases são capazes de produzir glicose e maltose a partir de amilose e uma série de oligossacarídeos (de 4 ou mais unidades de glicose) contendo as ligações α -1,6 glicosídicas, conhecidos como dextrina α -limite, a partir de amilopectina. A maior parte dos autores consideram α -amilases incapazes de hidrolisar ligações do tipo α -1,6, embora, segundo Kulp (1975), algumas dessas ligações possam ser rompidas em longos tempos de reação. A composição da dextrina obtida é dependente da fonte do amido e, principalmente, da fonte da enzima utilizada.

As α -amilases são estabilizadas na presença de íons de cálcio. Esses íons não aumentam a velocidade de reação, mas aumentam a estabilidade da enzima, reduzindo a desnaturação e garantindo maior vida útil. As α -amilases de algumas fontes são ativadas (apresentam maior taxa de hidrólise) na presença de halogênios.

As características bioquímicas das α -amilases são bastante variáveis dependendo da fonte, sendo muitas organismos que produzem diferentes isoenzimas. As α -amilases de mamíferos têm pH ótimo na neutralidade

α -amilases são produzidas por animais, vegetais, bactérias e fungos filamentosos, mas não leveduras alcoólicas. Hidrolisam ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina aleatoriamente, produzindo maltodextrina.

Enzimas bacterianas com atividade ótima acima de 70°C e altíssima estabilidade térmica são as que encontram maior aplicação na indústria de alimentos.

(de 6,0 a 7,0) enquanto as de cereais têm pH ótimo de atividade em meio ácido (em torno de 5,0). As α -amilases microbianas apresentam pH ótimo extremamente variável. As α -amilases de *Bacillus subtilis* apresentam maior atividade em valores de pH de 5,0 a 7,0, enquanto as α -amilases de *Geobacillus stearothermophilus* apresentam ótima atividade em pH = 3,0. Quanto à temperatura, a maior parte das α -amilases animais e vegetais apresenta ótima atividade em torno de 40°C. Há, no entanto, amilases microbianas com atividade ótima acima de 70°C e altíssima estabilidade térmica. Elas são de maior aplicação na indústria de alimentos, por dois motivos principais:

- O uso de altas temperaturas de reação reduz consideravelmente o risco de contaminação microbiana no meio reacional;
- O amido da maior parte das fontes gelatiniza em temperaturas superiores a 50°C. Dessa forma, enzimas com altas temperaturas de atividade evitam a necessidade de gelatinização prévia do amido e subsequente resfriamento do meio reacional.

As α -amilases mais aplicadas em processos na indústria de alimentos são as obtidas de bactérias do gênero *Bacillus* (*B. lincheniformis* e *B. subtilis*, pH de 6,0 a 7,0; temperatura de 60 a 85°C) e aquelas produzidas por fungos, do gênero *Aspergillus* (*A. oryzae* e *A. niger*, pH = 5,0; temperatura = 50°C).

β -amilases

As β -amilases (EC 3.2.1.2) são exoenzimas que hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4 do amido, a partir da extremidade não-redutora, liberando unidades de maltose, com inversão da configuração do C1 de α para β . São produzidas principalmente por vegetais: em sementes amiláceas, são encontradas em conjunto com as α -amilases (trigo e cevada, por exemplo); são também encontradas em batata-doce e em grãos de soja. A soja é considerada a melhor fonte para obtenção comercial de β -amilases devido à sua reduzida produção de

β -amilases são exo-enzimas que hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4 do amido, liberando unidades de maltose.

α -amilases. Microrganismos também são produtores dessas carboidrases (*Bacillus polymyxa*, por exemplo) mas não são conhecidas β -amilases de origem animal.

O resultado da hidrólise de amilose por β -amilases é cerca de 90% de maltose e 10% de glicose e maltotriose. A hidrólise desta última acontece de forma extremamente lenta e requer altas concentrações de enzima, uma vez que a maltose atua como inibidor competitivo da enzima. Sobre amilopectina, β -amilases realizam hidrólise incompleta, gerando de 50 a 60% de maltose e o restante corresponde a oligossacarídeos de alta massa molecular que contêm todas as ligações α -1,6 do polímero; esses são conhecidos como dextrinas β -limite.

As β -amilases vegetais apresentam maior atividade em valores de pH de 5,0 a 6,0 e são estáveis de 4,0 a 8,0, a 20°C. As enzimas de soja apresentam maior estabilidade em meio ácido do que as de trigo e cevada. Com relação à temperatura, sua atividade ótima é em torno de 30°C. Não são enzimas particularmente termoestáveis, perdendo grande parte de sua atividade após 30 min a 70°C. As β -amilases são enzimas sulfidrílicas e são, portanto, inativadas por oxidação. Sua atividade pode ser protegida e mesmo recuperada com uso de agentes redutores.

Glicoamilase ou amiloglicosidase

Glicoamilases ou amiloglicosidasas (EC 3.2.1.3.): são exoenzimas que removem unidades de glicose a partir da extremidade não-redutora das cadeias de amilose e amilopectina. São capazes de romper tanto ligações α -1,4, quanto ligações α -1,6 e α -1,3, tendo mais afinidade pelas ligações α -1,4. Com isso, as glicoamilases são, teoricamente, capazes de converter completamente amido em glicose. Na prática, entretanto, na ausência de α -amilases, a conversão nunca é completa, motivo pelo qual as duas enzimas são usadas em conjunto. Quando o meio reacional apresenta altos teores de glicose, as glicoamilases tendem a sintetizar isomaltoses (dissacarídeo composto por duas unidades de glicose ligadas por

Glicoamilases são exoenzimas que removem unidades de glicose e hidrolisam ligações α -1,4, α -1,6 e α -1,3. Podem sintetizar isomaltoses, o que leva a perdas no rendimento final em glicose.

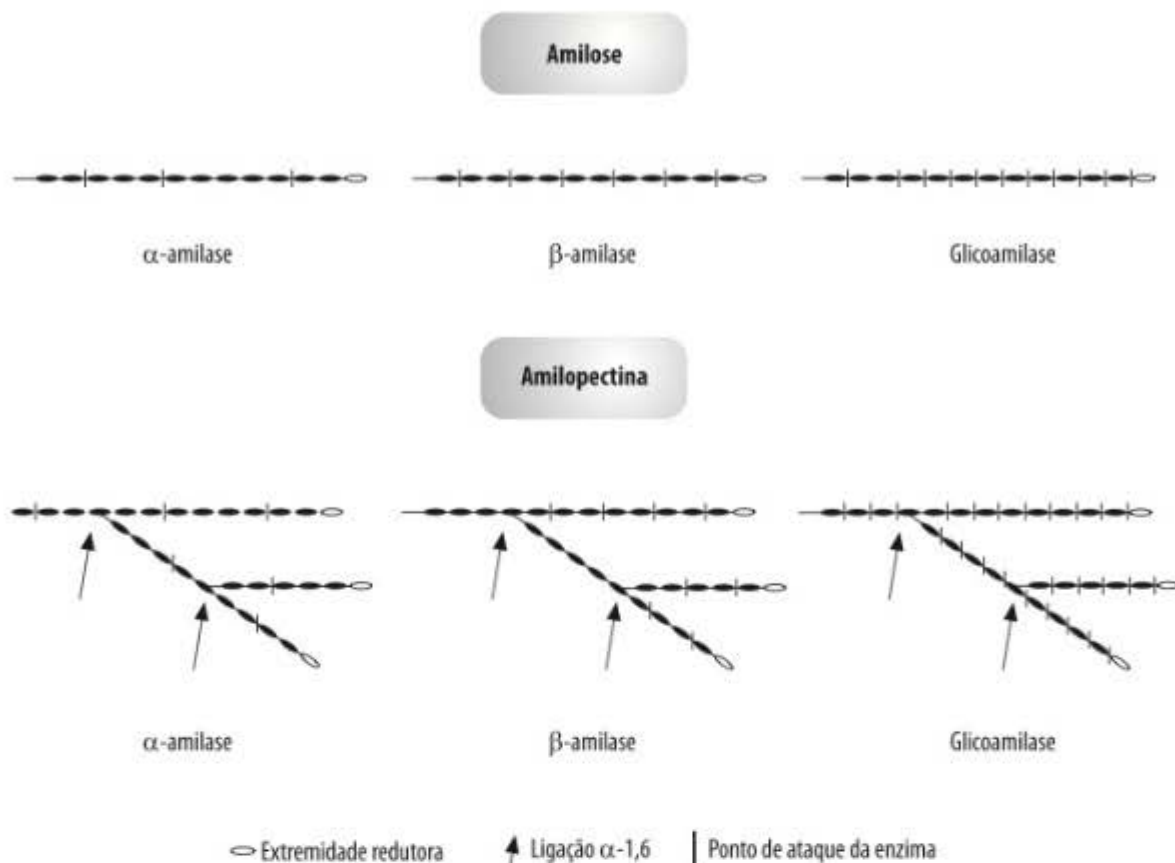


Figura 2.5 Resumo da atividade das principais amilases sobre amilose e amilopectina.

ligações α -1,6; Figura 2.1) que essas enzimas não são capazes de hidrolisar. Em escala industrial, esse aspecto pode representar uma perda significativa no rendimento final. As glicoamilases são produzidas basicamente por microrganismos, sobretudo fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*. Essas enzimas costumam apresentar atividade ótima em valores de pH de 4,0 a 5,0, em temperaturas de 50 a 60°C.

Enzimas desramificantes

Enzimas desramificantes são amilases que apresentam maior afinidade pela ligação α -1,6 do que pela ligação α -1,4. São elas:

A) *Isoamilase*. Sua ação é restrita a dextrinas de tamanho médio (não atua satisfatoriamente sobre a amilopectina nativa nem é capaz de hidrolisar isomaltose).

Enzimas desramificantes são amilases que apresentam maior afinidade pela ligação α -1,6 do que pela ligação α -1,4.

Produzida por vegetais (principalmente feijões) e por bactérias (do gênero *Flavobacterium*).

B) *Pululanase*. Tipo especial de isoamilase. Tem a mesma função desramificante porém possui a particularidade de ser capaz de hidrolisar pululana.¹ Produzida por bactérias dos gêneros *Aerobacter* e *Klebsiella*.

► Aplicação industrial

Bebidas alcoólicas

As fermentações que proporcionam a produção de bebidas alcoólicas são levadas a cabo por leveduras alcoólicas. Entretanto, esses microrganismos não são capazes de fermentar amido, pois não produzem amilases. Em consequência, antes da fermentação, é indispensável uma etapa de sacarificação do amido, isto é: hidrólise do amido a glicose e a maltose (além de maltodextrina); esses, sim, açúcares fermentáveis por leveduras alcoólicas.

Os processos de sacarificação usados para a produção de bebidas fermentadas dependem diretamente dos recursos disponíveis nos locais onde essas bebidas foram originalmente produzidas. Por exemplo:

- Europa e países andinos: uso de malte (amilases vegetais) para produção de cerveja, uísque etc.
- Oriente e América do Sul: uso de amilases fúngicas para a produção de saquê e de tiquira.
- Índios da Amazônia: uso de amilases animais (da saliva humana) para produção de caxiri (bebida à base de mandioca).

Preparação do malte (amilases de origem vegetal): São usadas sementes descascadas e selecionadas de cevada, submersas em água por de 2 a 3 dias, para absorção de umidade. As sementes são, então, levadas à câmara de germinação com condições controladas (temperatura de 15°C). Durante o processo de germinação, são formados fito-hormô-

Antes da fermentação é necessária uma etapa de sacarificação do amido; isto é, hidrólise do amido a açúcares fermentáveis por leveduras alcoólicas. Alguns processos se utilizam do malte, que consiste em enzimas de origem vegetal, principalmente amilases.

¹Pululana: polímero de maltotrioses, ligadas entre si por ligações α -1,6, produzido por algumas espécies de leveduras.

nios (giberelinas — que também podem ser adicionadas, na forma purificada, para aceleração do processo), que induzem à síntese de α - e β -amilases, além de β -glicanases, xilanases e proteases. Na Natureza, essas enzimas são usadas pela semente para hidrólise do amido de reserva do grão, fornecendo glicose para germinação do embrião. Quando a concentração das enzimas aumenta ao máximo (cerca de 1.000 \times), as sementes são secas e moídas. Essa preparação deve ser adicionada aos cereais que serão sacarificados para posterior fermentação.

Nos processos tradicionais, a ação das amilases produzidas leva à obtenção de uma concentração balanceada de açúcares fermentáveis a partir do amido de cevada, enquanto as outras carboidrases presentes no malte hidrolisam resíduos das paredes celulares do cereal, auxiliando nos processos de clarificação e filtração posteriores. Atualmente, muitas cervejarias utilizam como fonte de amido outros cereais diferentes da cevada (milho, sorgo, arroz), o que exige a aplicação de amilases exógenas para aumentar a eficiência da sacarificação. São, então, aplicadas α - e β -amilases purificadas, de origem microbiana, assim como enzimas desramificantes.

Panificação

As enzimas liberam glicose, maltose e dextrinas de forma lenta, e as leveduras fermentam na taxa ideal, melhorando a qualidade do pão. Além disso, a geração de dextrina na massa tem o efeito de retardar o endurecimento de pães, prolongando seu período de comercialização e consumo.

Assim como as bebidas alcoólicas, a massa do pão também é fermentada por leveduras. Nesse caso, o importante é a geração de CO_2 pelos microrganismos, que faz a massa crescer, formando pães com maior volume e melhor textura. A quantidade de açúcares fermentáveis naturais na massa é muito pequena para fazer diferença no processo fermentativo e a adição de açúcares pode apresentar o seguinte problema: com grande disponibilidade de substrato, as leveduras fermentam em taxa muito acelerada e a produção de CO_2 torna-se muito rápida. Com isso, a massa não consegue absorver o gás produzido, que escapa. A melhor solução é a adição de amilases à massa. Nas proporções corretas, as enzimas liberam glicose, maltose e dextrinas de forma lenta e gradual, durante os períodos de mistura e de descanso da

massa, e as leveduras fermentam na taxa ideal, fazendo a massa crescer mais e melhorando a qualidade do pão. Pequenas quantidades de glicose livre ainda auxiliam na formação da cor da casca do pão, entrando como substrato da reação de Maillard (escurecimento químico). Em excesso, as amilases podem provocar sacarificação da massa, deixando-a grudenta e mais difícil de ser trabalhada. Em casos extremos, após o período no forno, o pão apresentará textura muito dura e interior caramelizado.

Outro importante efeito da adição de amilases à massa do pão é o aumento de sua vida de prateleira. Uma das principais causas do fim da vida útil de produtos de panificação é o seu endurecimento. A mudança na textura, que determina o fim do “frescor” do produto e causa rejeição pelo consumidor, é causada pela retrogradação do amido, embora alguns autores creditem esse fenômeno principalmente à formação de ligações cruzadas entre o amido e a fração protéica presente no pão. Independentemente da causa, o fato é que a geração de dextrina na massa tem o efeito de retardar o endurecimento de pães, prolongando seu período de comercialização e de consumo.

A escolha da fonte das amilases a serem aplicadas na massa depende basicamente da termoestabilidade das enzimas e, em consequência, do risco de superdosagem. Tradicionalmente, são aplicadas à massa α -amilases de *Aspergillus oryzae* que, em conjunto com as β -amilases naturalmente presentes na farinha de trigo (e também de outros cereais), apresenta bons resultados quanto ao volume final do pão. Entretanto, por serem termolábeis, essas enzimas só são ativas até o momento em que a massa vai para o forno. Nesse período, o amido ainda não foi gelatinizado e apenas a fração danificada durante a obtenção da farinha (de 7 a 9% do amido) está disponível para a ação das enzimas. Assim, esse procedimento, tanto quanto a adição de malte — tradicional em alguns países — garante o aumento do volume do pão, mas tem relativamente pouco efeito na manutenção do frescor ao longo da vida de prateleira.

A aplicação de amilases termorresistentes, de origem bacteriana, apresenta melhores resultados, pois essas enzimas resistem à temperatura do forno e têm acesso ao amido gelatinizado, podendo aumentar a proporção de dextrina na massa, influenciando a manutenção do frescor. Entretanto, por serem termorresistentes, essas enzimas apresentam alto risco de superdosagem, com efeitos extremamente indesejados. Para minimizar o risco, uma alternativa é aplicar uma mistura de amilases termorresistentes bacterianas e amilases termolábeis de origem fúngica. Mais recentemente, vêm sendo aplicadas amilases de estabilidade térmica intermediária (produzidas por espécies de *Aspergillus* e por *Bacillus megaterium*) capazes de suportar o período inicial de cozimento no forno, tendo acesso ao amido gelatinizado, mas não resistindo ao cozimento completo e, portanto, oferecendo pequeno risco de hidrólise excessiva.

Amido hidrolisado

Os primeiros processos de hidrólise do amido eram processos químicos que tinham por objetivo obter adoçantes que pudessem substituir a sacarose em diferentes formulações de alimentos. Segundo essa metodologia, a suspensão de amido é levada a pH = 1,5, por adição de HCl, e é cozida a temperatura de 140°C, em autoclave. O produto obtido chega a, no máximo, 40^{DE} (dependendo do tempo de cozimento) e não é aconselhável utilizar-se um tempo muito longo pois pode favorecer a formação de gentabiose — trissacarídeo de sabor muito amargo, que inutiliza o produto. O surgimento de enzimas comerciais de ação eficaz e resistentes a altas temperaturas vem provocando, gradualmente, a mudança dos processos industriais de químico para enzimático, que apresenta um produto final de melhor qualidade em condições muito mais brandas de processo.

▼

O equivalente de dextrina (DE) é calculado, geralmente, pela média ponderada das concentrações de glicose, maltose e maltotrioses. O fator de ponderação usado é o grau de polimerização (DP) dos produtos (glicose — DP = 1,0; maltose — DP = 0,5; maltotriose — DP = 0,33).

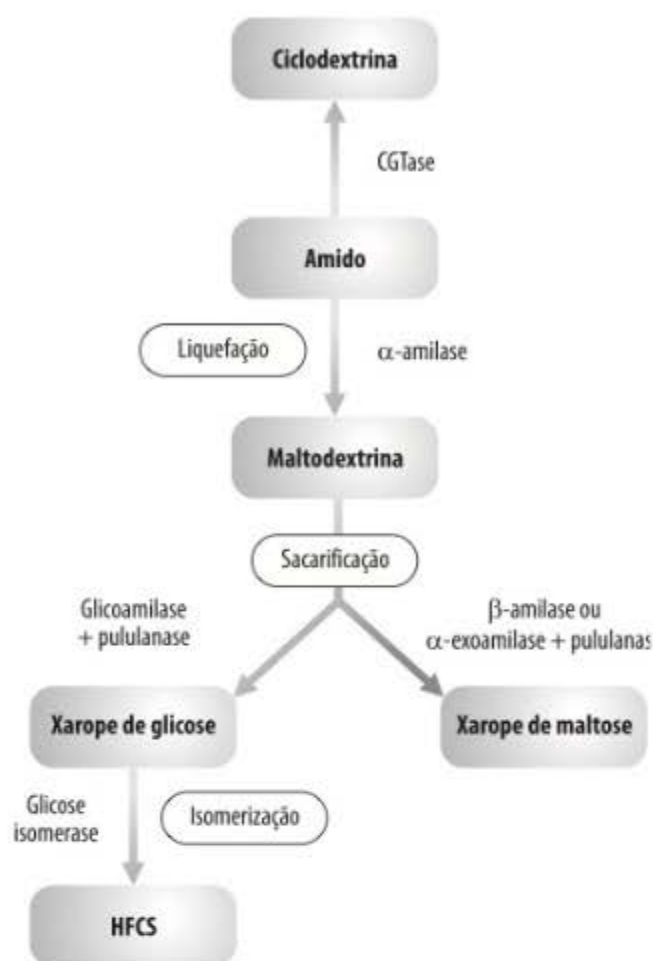


Figura 2.6 Processos e produtos obtidos pela modificação enzimática do amido.

Dependendo da enzima e das condições de reação utilizadas, uma gama de produtos pode ser obtida a partir do amido, com aplicação em vários produtos alimentícios e não-alimentícios. Os diferentes processos podem ser didaticamente divididos em hidrólise parcial e extensiva do amido e estão resumidos na Figura 2.6.

Hidrólise parcial do amido ou liquefação: obtenção de maltodextrinas. Consiste na hidrólise do amido gelatinizado por α -amilases de origem bacteriana (*Geobacillus stearothermophilus*, $T = 85$ a 110°C , $\text{pH} = 5,3$ a $6,5$) ou fúngica (*Aspergillus oryzae*, $T = 55$ a 70°C , $\text{pH} = 4,0$ a $5,0$). O processo recebe o nome de liquefação, pois a ação das enzimas sobre a suspensão de amido provoca considerável redução de sua viscosidade.

O processo recebe o nome de liquefação, pois a ação das enzimas sobre a suspensão de amido provoca considerável redução de sua viscosidade.

Em geral, o meio reacional é composto por uma suspensão de amido com 30 a 40% de sólidos (altas concentrações de substrato tendem a estabilizar α -amilases) adicionada de CaCl_2 , cuja finalidade é o aumento da estabilidade da enzima. A extensão da hidrólise é controlada pelo tempo de reação e expressa em equivalentes de dextrina (DE). O valor de DE é variável de acordo com a aplicação da maltodextrina obtida:

- De 5 a 8^{DE}: têm a capacidade de formar géis termorreversíveis e são usadas como substituintes de gordura.
- De 8 a 15^{DE}: usadas para subsequente sacarificação (obtenção de xaropes de glicose ou maltose).
- De 15 a 40^{DE}: aplicadas como estabilizantes e espessantes em diversos produtos, sobretudo as maltodextrinas de até 25^{DE}.

Maltodextrinas são carboidratos perfeitamente digeridos e absorvidos no intestino humano, não sendo, portanto, consideradas substâncias pré-bióticas (ver mais detalhes no item Lactases — produção de galactoligossacarídios). Entretanto, alguns autores relataram a redução de populações de bactérias putrefativas (*Clostridium perfringens*, por exemplo) em consumidores de xaropes de glicose e maltose, ricos em maltotetroses. É fato indicativo de que o consumo de maltoligossacarídios possa ser benéfico à saúde.

Hidrólise extensiva do amido: sacarificação. Obtenção de xarope de glicose. Consiste na conversão de maltodextrina para até 97% de glicose pela aplicação de glicoamilases (*Aspergillus niger*, T = 55 a 65°C, pH = 3,5 a 5,0) auxiliadas por enzimas desramificantes (pululanase de *Bacillus acidopollulyticus*, T = 55 a 65°C, pH = 3,5 a 5,0).

A glicose assim obtida pode ser transformada em frutose para produção de xaropes com maior poder adoçante (HFCS — *high fructose corn syrup*), cuja principal aplicação é a substituição da sacarose nos mais diversos

O processo recebe o nome de sacarificação, pois a conversão a 97% de glicose aumenta o poder edulcorante.

produtos. Os principais produtos comerciais, HFCS42 e HFCS55 têm respectivamente 42% e 55% de frutose que é obtida pela ação da enzima xilose-isomerase², tendo glicose como substrato. O processo aplica enzimas intracelulares, imobilizadas, extraídas de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, em pH de 7,0 a 8,0 e temperatura de 55 a 60°C.

Obtenção de xarope de maltose. Consiste na aplicação de enzimas maltogênicas sobre a maltodextrina. Podem ser aplicadas α -amilases fúngicas, com produção de maltose e glicose, ou β -amilases de cevada (malte) ou de soja. Essa sacarificação é geralmente conduzida de 55 a 60°C em pH de 4,8 a 5,2, partindo de uma solução que contém de 35 a 45% de sólidos. Normalmente se obtém um produto com 50 a 55% de maltose. Para melhor conversão, é recomendável o uso de dextrinas de baixo DE e a adição de pululanases, o que pode elevar os níveis de maltose para cerca de 80%.

Além das aplicações apresentadas na Tabela 2.2, xaropes de maltose e glicose podem ainda ser utilizados na produção de álcool de cereais por fermentação com leveduras alcoólicas. O álcool de cereais é mais puro do que o da cana-de-açúcar, pois contém menos odores, pigmentos etc. É utilizado na produção de licores finos e em produtos farmacêuticos. O xarope de maltose pode ainda ser utilizado na produção de maltitol, adoçante de baixo teor calórico e que não provoca cáries.

Mais recentemente, xaropes de maltose e de glicose vêm sendo utilizados como matérias-primas para a obtenção enzimática de oligossacarídeos pré-bióticos, que são adicionados aos alimentos como ingredientes funcionais. Dentre eles, os mais importantes são os isomaltoligossacarídeos (tri- e tetrassacarídeos: uma unidade de maltose e uma de glicose ou duas unidades de maltose ligadas

Os xaropes de glicose e maltose podem ser ainda utilizados na obtenção de álcool de cereais e na produção de oligossacarídeos pré-bióticos.

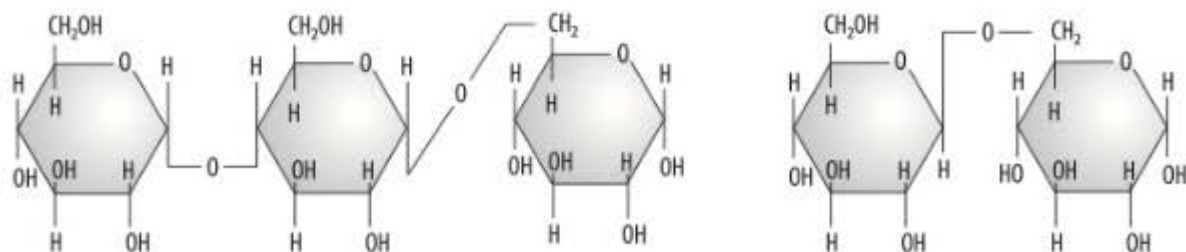
²A enzima xilose-isomerase tem como substrato preferencial a xilose, porém essa enzima apresenta suficiente atividade sobre a glicose para ser aplicada em processos industriais. Na prática, ela é muitas vezes denominada glicose-isomerase.

Tabela 2.2 Principais aplicações dos xaropes de maltose, glicose e frutose.

Maltose (%)	Glicose (%)	Frutose (%)	Aplicação	Efeito
50 a 65	2 a 12	0	Produtos de panificação, confeitaria, congelados e cervejas	Controle da textura, da umidade e das características de congelamento; melhoria da cor e controle da concentração de açúcares fermentáveis.
70 a 88	0 a 10	0	Sorvetes e balas	Controle da higroscopicidade; evita cristalização.
30 a 37	53 a 43	0	Geléias, refrigerantes, produtos de panificação	Controle da doçura, da viscosidade e da higroscopicidade; estabilização do <i>flavor</i> e espessante.
1 a 2	94 a 97	0	Alimentos infantis e para atletas, geléias, produtos de panificação	Fonte de energia instantânea; controle da doçura; confere brilho e promove caramelização e a reação de Maillard.
0	10 a 55	42 a 90	Doces, refrigerantes, condimentos e molhos, cereais, sorvetes, produtos de panificação	Substituição da sacarose; umectante; evita cristalização e promove reações de escurecimento.

por ligação do tipo α -1,6), obtidos por ação de α -glicosidases, e os gentiologossacarídeos (várias unidades de glicose ligadas entre si por ligações β -1,6), sintetizados por β -glicosidases.

Produção de ciclodextrinas. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, produzidos pela ação da enzima ciclomalto-dextrina-glucano-transferase (CGTase) sobre o amido. A reação consiste na hidrólise das cadeias do amido, separando oligossacarídeos de 6, 7 ou 8 unidades de glicose e na subsequente formação de oligossacarídeos cíclicos (alfa, beta e gama, respectivamente) por uma transgli-

**Figura 2.7** Estrutura dos isomaltoligossacarídeos e da gentiobiase.

cosilação intramolecular. CGTases são produzidas por algumas bactérias; as mais importantes são as do gênero *Bacillus* (*B. macerans* e *B. circulans*). Todas as classes de CGTases são capazes de produzir as três ciclodextrinas mais comuns, e a proporção entre elas varia com a fonte da enzima, do amido e com as condições de reação.

A aplicação das ciclodextrinas está intimamente ligada à sua estrutura, na qual as hidroxilas das glicoses projetam-se para fora do anel formado, deixando uma cavidade hidrofóbica interna capaz de complexar diversos compostos. Pela formação desses complexos, as ciclodextrinas são excelentes veículos para dispersão de compostos hidrofóbicos (aromas, pigmentos, fármacos, compostos ativos) em matrizes aquosas. Para aumentar essa capacidade, a solubilidade de ciclodextrinas em água pode ser melhorada pela inclusão de ramificações (glicoses e/ou maltoses) pela ação reversa de enzimas desramificantes.

As CGTases são ainda utilizadas na produção de glicosil-sacarose, trissacarídeo formado pela transferência de uma unidade de glicose do amido para uma molécula de sacarose. Esse açúcar, conhecido como “*coupling sugar*” não tem atividade pré-biótica, mas é um produto não-cariogênico, com cerca de 50% da doçura da sacarose, utilizado como agente anticristalização, que não

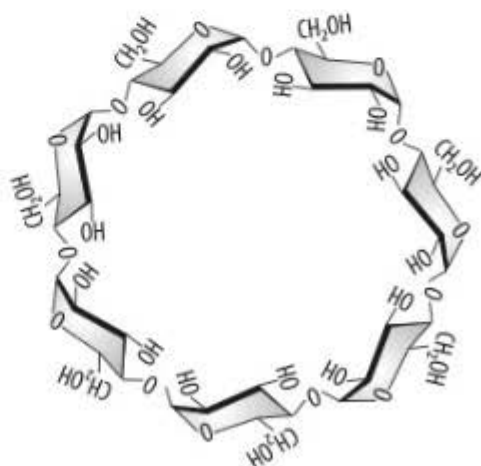


Figura 2.8 Estrutura da β-ciclodextrina.

Ciclodextrinas são usadas como dispersantes de substratos hidrofóbicos em matrizes aquosas.

sofre escurecimento químico e que tem ação supressora da retrogradação.

► Métodos de detecção da atividade

Os principais métodos para determinação da atividade de amilases baseiam-se em: perda de viscosidade da solução de amido, perda da capacidade de formar complexos azuis na presença de iodo, surgimento de grupos redutores no meio reacional. De acordo com o resultado obtido por esses ensaios, pode-se determinar o tipo de amilase presente na amostra, como pode ser visto na Tabela 2.3.

Para que se possa distinguir as β -amilases das glicoamilases, é necessário um ensaio para verificação do principal produto de reação — glicose (glicoamilase) ou maltose (β -amilase). Um método prático consiste na cromatografia em papel do produto de reação, em comparação com padrões. Pode-se ainda determinar a liberação de glicose por métodos enzimáticos específicos.

► Pectinases

Pectinases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre unidades de ácido galacturônico ou seu derivado metoxilado.

Pectinases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre unidades de ácido galacturônicos ou seu derivado metoxilado. São produzidas por vegetais e microrganismos e seu substrato são os polissacarídeos constituintes da lamela média e da parede primária de células vegetais. Em virtude disso, pectinases endógenas podem causar importantes alterações na textura de frutas e de hortaliças. Sua aplicação na indústria de alimentos, no entanto, pode trazer uma série de benefícios

Tabela 2.3 Comportamento do meio reacional (solução/suspensão de amido) após ação de diferentes amilases.

	α -amilase	β -amilase	Glicoamilase
<i>Perda de viscosidade</i>	Rápida	Lenta	Lenta
<i>Perda de cor azul (com iodo)</i>	Rápida	Lenta	Lenta
<i>Formação de grupos redutores</i>	Lenta	Rápida	Rápida

à obtenção de produtos de origem vegetal. Nesses casos, geralmente são aplicadas pectinases microbianas.

► Substrato

As substâncias pécticas, carboidratos poliméricos componentes da parede celular e da lamela média de vegetais, são um grupo bastante heterogêneo de polisacarídeos com diferentes massas moleculares e graus de esterificação.

A parede celular confere rigidez e proteção à célula vegetal sem, no entanto, interferir na permeabilidade da membrana. É a responsável pela manutenção da turgidez do tecido vegetal.

Em células jovens, ainda em crescimento, encontra-se apenas uma parede primária que envolve a membrana plasmática. Essa parede primária é formada principalmente por celulose (na forma de microfibrilas) envolvida por uma matriz de substância péctica (cerca de 35%) e de hemicelulose. A parede primária, por sua vez, é envolvida pela lamela média (formada principalmente por substâncias pécticas), que é a responsável por manter as células unidas umas às outras (como um cimento).

Quando pára de crescer e entra no estágio de amadurecimento, a célula passa a depositar material entre a membrana plasmática e a parede primária, formando a chamada parede secundária. Essa é mais rígida e mais espessa que a primária, pois contém maiores proporções de celulose e menores de substâncias pécticas e hemicelulose. É comum, na parede secundária, a deposição de lignina (conjunto de compostos fenólicos complexos), o que confere muito maior rigidez ao tecido vegetal. A estrutura da parede secundária pode ser dividida em duas partes, de acordo com a orientação das microfibrilas de celulose que a formam.

Em frutos verdes, a substância péctica predominante é chamada de protopectina e consiste em cadeias de ácidos galacturônicos metoxilados (esterificados com metanol)

As substâncias pécticas são carboidratos componentes da parede celular e da lamela média de vegetais. Em frutos verdes, a substância péctica predominante é a protopectina, insolúvel em água e responsável pela textura firme. Em frutos maduros elas são compostas por cadeias de ácidos galacturônicos e por seus derivados metoxilados ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4.

ligadas entre si por íons metálicos divalentes (Ca^{++} ; Mg^{++}), por cadeias de outros carboidratos (arabinose, galactose, ramnose e xilose, principalmente), por ácido fosfórico além de pontes de hidrogênio. A protopectina é insolúvel em água e responsável pela textura firme dos frutos verdes. Ao longo da maturação, pectinases endógenas (protopectinases) hidrolisam a protopectina, gerando pectinas solúveis e contribuindo para o amolecimento do fruto. O processo de maceração, no qual são aplicadas poligalacturonases fúngicas, funciona de forma bastante semelhante.

Em frutos maduros, a maior parte das substâncias pécticas (de 60 a 90%) consiste na chamada pectina linear (*smooth-region pectin*), composta por cadeias de ácidos galacturônicos e por seus derivados metoxilados, ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Em geral essas substâncias são altamente esterificadas (de 65 a 98% das unidades) e apresentam grau de polimerização de algumas dezenas a várias centenas de unidades monoméricas. De 10 a 40% das substâncias pécticas dos vegetais são regiões ramificadas (*hairy region pectin*), compostas por açúcares neutros (arabinose, xilose, ramnose e galactose) que se ligam às cadeias de ácidos galacturônicos (nas posições 2 e/ou 3) e à hemicelulose presente nas paredes celulares de vegetais.

Outras denominações são ainda aplicadas às substâncias pécticas:

Pectina: termo geral para substâncias pécticas capazes de formar géis em meio ácido e na presença de açúcar.

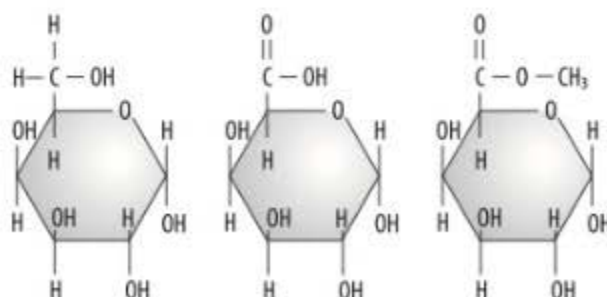


Figura 2.9 Galactose, ácido galacturônico e ácido galacturônico metoxilado.

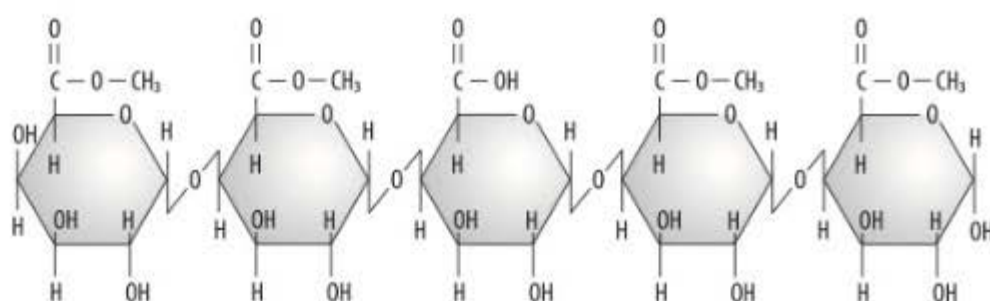


Figura 2.10 Estrutura da pectina.

Contêm 75% ou mais de ácidos galacturônicos esterificados com metanol.

Ácido pectínico: grupo de substâncias, incluindo a pectina, que contém mais que um número negligenciável de unidades de ácido galacturônico metoxilado em sua estrutura. É geralmente aplicado como sinônimo para pectinas com baixo teor de metoxilação.

Ácido pectico (ou pectato): grupo de substâncias formadas basicamente por ácidos galacturônicos, contendo quantidades negligenciáveis de metoxilas.

► Fontes e principais características

As pectinases são classificadas de acordo com seu modo de ação, substrato preferencial e reação catalisada. Inicialmente, as pectinases podem ser divididas em: enzimas desmetoxilantes e enzimas despolimerizantes.

Enzimas desmetoxilantes são conhecidas como pectinaesterases ou pectina-metil-esterases. São hidrolases que atacam a ligação éster, desmetoxilando ácidos ga-

Enzimas desmetoxilantes são conhecidas como pectinaesterases ou pectina-metil-esterases (PME). Hidrolisam a ligação éster desmetoxilando os ácidos metoxilados e liberando metanol.

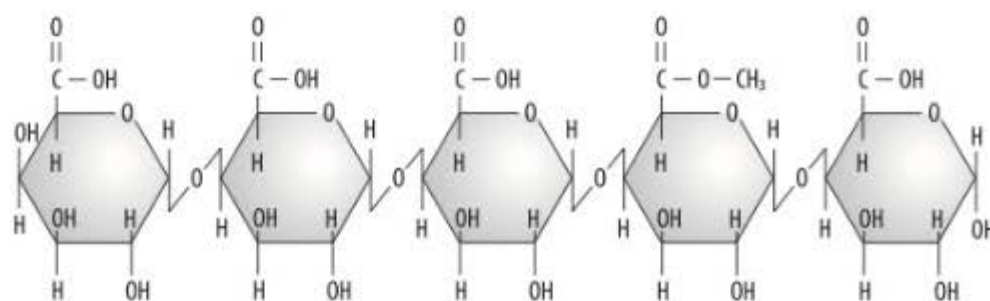


Figura 2.11 Estrutura do ácido pectico.

lacturônicos esterificados com metanol. O resultado de sua ação são pectinas com baixo teor de metoxilação ou ácido péctico, além de metanol. A ação das pectinaesterases sobre a pectina tem duas importantes consequências devido à geração de pectato:

- Aumento da susceptibilidade do polissacarídeo ao ataque de certas enzimas despolimerizantes;
- Susceptibilidade do polissacarídeo à precipitação na presença de Ca^{++} , pela geração de pectato de cálcio. A presença de grupos carboxílicos sucessivos ao longo do polímero permite a formação de ligações cruzadas mediadas por cálcio (e outros íons divalentes) que provoca sua insolubilização/precipitação.

Pectinaesterases são produzidas tanto por vegetais quanto por microrganismos. As de origem vegetal atacam a extremidade não-redutora da cadeia de polissacarídeo (no caso das exoenzimas) ou regiões próximas a grupos carboxílicos livres (endoenzimas) e seguem a desmetoxilação ao longo da molécula por mecanismo de cadeia simples (ou única), o que gera longos trechos de ácidos galacturônicos na molécula, deixando-a altamente sensível à precipitação por cálcio. Irregularidades na cadeia (como a presença de regiões ramificadas) inibem a ação dessa enzima. Sua atividade é maior em substratos de alto grau de polimerização, sendo inativas sobre substratos de três unidades monoméricas ou menos. São enzimas altamente específicas que hidrolisam outros ésteres em taxas extremamente lentas. As pectinaesterases fúngicas

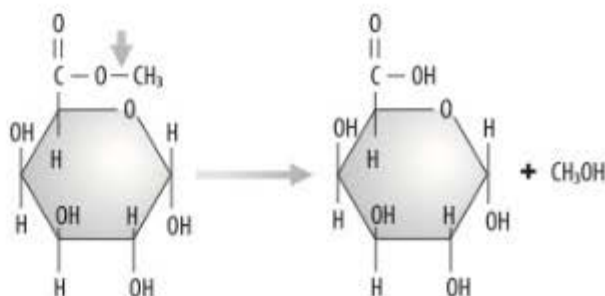


Figura 2.12 Ação das pectinaesterases.

Enzimas despolimerizantes (poligalacturonases, pectina liases e pectato liases) atacam as ligações glicosídicas α -1,4 entre as unidades constituintes das substâncias pécicas, podendo agir como hidrolases ou como liases, liberando ácido galacturônico (exoenzimas) ou oligossacarídeos (endoenzimas).

diferem das vegetais por agirem por mecanismo multicadeia, promovendo a desmetoxilação totalmente ao acaso e, portanto, gerando pectinas com baixo teor de metoxilação, porém bastante resistentes à precipitação por cálcio, aplicadas na confecção de geléias com baixo teor de açúcares.

Enzimas despolimerizantes atacam as ligações glicosídicas α -1,4 entre as unidades constituintes das substâncias pécicas, podendo agir como hidrolases ou como liases (lisando a ligação via β -eliminação com formação de dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 do carboidrato). Ambas as enzimas podem apresentar modo de ação de endo- ou exocarbohidrases.

Quanto ao substrato, as enzimas despolimerizantes são separadas por atacarem preferencialmente as ligações entre ácidos galacturônicos (em pectinas com baixo teor de metoxilação ou ácido pécico) ou entre ácidos galacturônicos metoxilados (pectinas de alto teor de metoxilação). No primeiro caso, encontram-se as poligalacturonases e as pectatoliases, cuja atividade decresce com o aumento do grau de metoxilação do substrato. A exceção são as pectatoliases bacterianas que apresentam maior atividade sobre pectinas de baixo teor de metoxilação e não sobre o ácido pécico. No segundo caso, são conhecidas apenas pectinaliases, fortemente ativadas na presença de cálcio e de outros íons divalentes. A existência de polimetilgalacturonases ainda não foi demonstrada. No entanto, a hidrólise de pectinas altamente metoxiladas pode ser facilmente alcançada pela ação combinada de pectinaes-terases e poligalacturonases ou de pectinaliases.

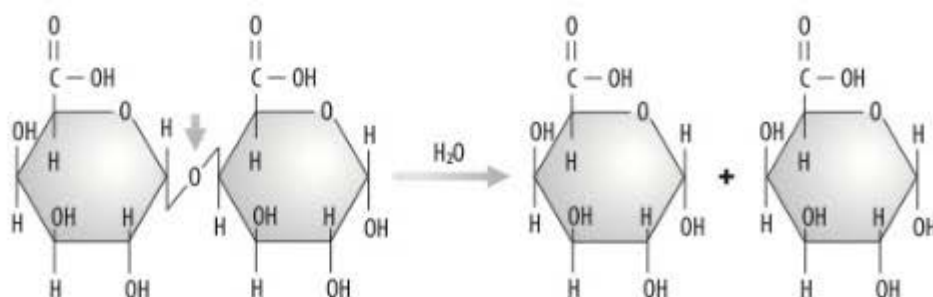


Figura 2.13 Ação das poligalacturonases.

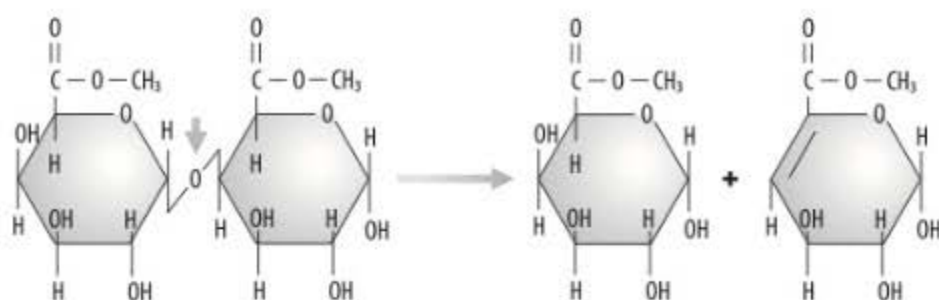


Figura 2.14 Ação das pectinálises.

Um terceiro grupo de enzimas pode ser incluído entre as pectinases: são as ramnogalacturonases capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas entre ramnose e ácidos galacturônicos nas regiões ramificadas das substâncias pécicas. Sua ação libera oligômeros formados por ácido galacturônico e açúcares neutros, como a ramnose, mas também arabinose, galactose e xilose. Esse tipo de atividade foi detectado em preparados de pectinases comerciais, produzidos por fungos filamentosos.

Pectinases comerciais: são preparados que contêm uma variedade de enzimas fúngicas (em geral de *Aspergillus* sp.) e que apresentam atividade de pectinaesterase, poligalacturonase e pectinálise, além de atividade celulolítica (pela presença de β -endoglicanases) e hemicelulolítica,

Pectinases comerciais: são preparados contendo uma variedade de enzimas fúngicas apresentando atividade de pectinaesterase, poligalacturonase e pectinálise além de atividade celulolítica e hemicelulolítica.

Tabela 2.4 Resumo das pectinases, seus substratos e produtos.

	Enzima	Substrato	Produto da Reação	Fonte
Desmetoxilante 1	Pectinesterase EC 3.1.1.11.	Pectina	Ácido pécico + metanol	Vegetais e microrganismos
Despolimerizante 1 2 3	Endopoligalacturonase EC 3.2.1.15.	Ácido pécico	Oligossacarídios (ação randômica)	Vegetais e microrganismos
	Exopoligalacturonase EC 3.2.1.67.		Mono- e dissacarídios (extremidade não-redutora)	
	Endopectatoliase EC 4.2.2.2.	Ácido pécico	Oligossacarídios (ação randômica)	Microrganismos
	Exopectatoliase EC 4.2.2.9.		Mono- e dissacarídios (extremidade redutora)	
	Endopectinálise EC 4.2.2.10.	Pectina	Oligossacarídios (ação randômica)	Microrganismos

Tabela 2.5 Principais fontes de pectinases.

Enzima	Vegetais	Microrganismos	
<i>Pectinaesterase</i>	Maçã, banana, cítricos, cereja, uva, manga, mamão, maracujá, pêra, cenoura, couve-flor, abóbora, cebola, batata, tomate	Fungos: <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Sclerotia</i> sp.	Bactérias: <i>Clostridium</i> sp.
<i>Poligalacturonase</i>	Maçã ¹ , abacate ² , banana ¹ , cereja ¹ , manga ¹ , mamão ³ , maracujá ³ , pêssego ³ , pêra ³ , cenoura ¹ , abóbora ² , batata ¹ , tomate ³	Fungos: <i>Aspergillus niger</i> ³ , <i>Penicillium</i> sp. ² , <i>Fusarium</i> sp. ² , <i>Rhizopus</i> sp. ² , <i>Sclerotia</i> sp. ³ , <i>Colletotrichum</i> sp. ³	Leveduras: <i>Kluyveromyces</i> sp. ² Bactérias: <i>Erwinia</i> sp. ³
<i>Pectatoliase</i>		Fungos: <i>Fusarium</i> sp. ²	Bactérias: <i>Bacillus polymyxa</i> ² , <i>Erwinia</i> sp. ³ , <i>Pseudomonas</i> sp. ² , <i>Arthrobacter</i> sp. ² , <i>Clostridium</i> sp. ¹
<i>Pectinaliase</i>		Fungos: <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Sclerotia</i> sp.	Bactérias: <i>Pseudomonas</i> sp.

¹Exoenzimas, ²endoenzimas, ³endo- e exoenzimas.

todas enzimas produzidas pelo mesmo microorganismo. Em alguns casos, são adicionadas exocelulases de outras fontes microbianas.

► Celulases e hemicelulases

► Substrato

A celulose é um polímero formado por inúmeras unidades de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4. É o polímero mais abundante do planeta. Nas paredes celulares ela se liga às substâncias pécticas por polímeros de xilose e glicose chamados de hemicelulose.

A celulose é um polímero formado por inúmeras unidades de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4. Essas cadeias podem estar ligadas entre si por pontes de hidrogênio, formando regiões cristalinas ou podem não estar ligadas, formando regiões amorfas (que representam apenas cerca de 15% do total). O conjunto das cadeias de glicose (regiões cristalinas e amorfas) forma as fibrilas da celulose que, unidas, formam as microfibrilas (com diâmetro de aproximadamente 30 Å). Nas paredes celulares, a celulose liga-se às substâncias pécticas por polímeros de xilose e glicose (xilanas e xiloglicanas), denominados hemiceluloses. O nome é dado também a outros carboidratos poliméricos, como as galactomananas e as β -glicanas, além de outras gomas presentes no tecido vegetal.

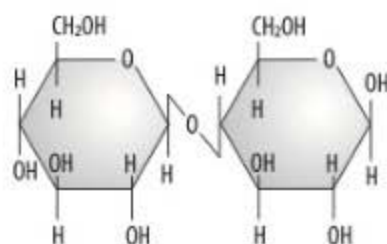


Figura 2.15 Ligação β -1,4. Celobiose.

► Fontes e principais características

Celulases são carboidrases capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades de glicose.

Celulases são enzimas hidrolíticas (carboidrases) capazes de romper as ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades de glicose. Existem quatro tipos de celulases:

Endo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.4. – Cx celulase): rompem a celulose, desordenadamente, no meio da molécula, liberando oligossacarídeos β -1,4. Muitas endo-glicanases não são capazes de atacar celulose cristalina, agindo apenas sobre a fração amorfa do polímero e fazendo uma hidrólise incompleta. Glicanases capazes de atacar celulose cristalina são bem raras e, em geral, de ação muito lenta.

Exo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.91. – celobio-hidrolase): rompem a celulose a partir da extremidade, liberando glicose e celobiose (dissacarídeo de glicose β -1,4).

β -glicosidases (EC 3.2.1.21. – Celobiase): rompem a celobiose, liberando glicoses. Atuam também como exo enzimas sobre oligossacarídeos β -1,4.

Glico-hidrolases (EC 3.2.1.74.): removem unidades de glicose da extremidade de polímeros (celulose) e oligômeros de alto peso molecular.

As celulases são produzidas apenas por microrganismos: bactérias anaeróbias do trato digestório de ruminantes e de outros herbívoros e fungos filamentosos: do solo — degradadores de madeira ou fitopatogênicos. Os principais organismos produtores são *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma viridae*.

Na Natureza, esses microrganismos são extremamente eficientes na degradação da celulose, embora os extra-

tos enzimáticos produzidos por eles não apresentem a mesma eficiência *in vitro*. Para resultados satisfatórios, é indispensável um pré-tratamento da celulose, com choque ácido ou alcalino, ou por moagem, para destruição das porções cristalinas do polímero. Esse tratamento eleva muito o custo do processo, tornando-o antieconômico. Por isso, as celulases são usadas, em conjunto com enzimas pectinolíticas e com hemicelulases, na extração de sucos e no tratamento do café, mas não na obtenção de glicose a partir de celulose.

Hemicelulases são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos classificados como hemiceluloses. Entre elas, as mais importantes são as xilanases (hidrolisam ligações do tipo β -1,4 entre unidades de xilose), as arabanases e as β -glicanases. São produzidas em conjunto com as pectinases por diversos fungos filamentosos, aplicados na sua produção comercial; como, por exemplo: *Aspergillus niger*.

► Aplicação industrial

Enzimas endógenas

Pectinaesterase. Um problema recorrente na produção de sucos cítricos (frutos que apresentam alta atividade pectinaesterase e atividade pouco significativa de enzimas

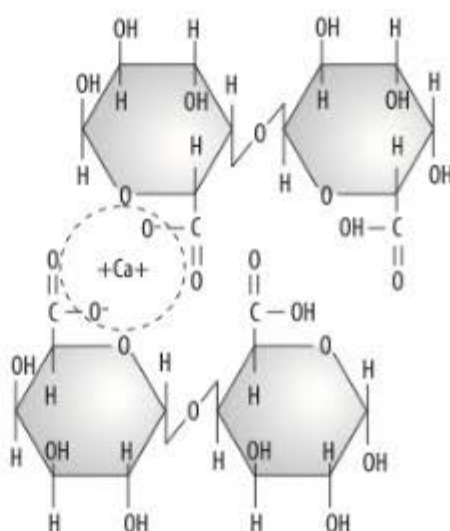


Figura 2.16 Formação de pectato de cálcio.

Hemicelulases são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos classificados como hemicelulose. Entre elas as mais importantes são xilanases.

despolimerizantes) é a perda da turbidez e a separação de fases no suco. Quando desesterificam a pectina em suspensão no suco, as pectinaesterases geram ácido péctico que, na presença de cálcio natural dos sucos, precipita, causando clarificação. Em sucos concentrados, a formação de géis de pectato de cálcio impede a reconstituição satisfatória do suco.

Esse fenômeno é especialmente importante em suco de laranja, devido ao volume produzido e comercializado deste suco, e tem sido bastante estudado. A maior parte das variedades de laranja contém cerca de 12 isoformas de pectinaesterase, em todos os tecidos do fruto. Essas isoenzimas diferem entre si por sua estabilidade térmica, afinidade por pectinas de baixo teor de metoxilação (grau de desesterificação que podem provocar) e por sua capacidade de clarificação, que está diretamente ligada ao modo de ação da enzima (unicadeia ou multicadeia). A principal dificuldade de controle do problema reside na existência de uma isoforma termorresistente que depende de tratamentos térmicos drásticos para inativação o que, por sua vez, leva a alterações no sabor do suco obtido.

Uma possibilidade de se contornar o problema é a adição de pectinálises ou poligalacturonases ao suco. Na presença dessas enzimas, a pectina ou ácido péctico são hidrolizados a oligômeros não-sensíveis ao cálcio. A hidrólise contribui para a redução da viscosidade do suco e aumenta o teor de sólidos solúveis, proporcionando sucos concentrados com valores de °Brix mais elevados.

Atualmente, a concentração de suco de laranja é feita em evaporadores multiestágios, cuja temperatura é suficiente para inativação das pectinaesterases nativas. Alterações de sabor são contornadas pela recuperação e reincorporação de aromas ao suco concentrado. Desse modo é possível garantir a estabilidade da turbidez do suco sem maiores danos às suas propriedades organolépticas.

A atividade de pectinaesterase é explorada durante a secagem do bagaço (principalmente o albedo) da laranja, para aproveitamento como ração animal. Nesses casos,

▼

A atividade de pectinaesterase é explorada durante a secagem do bagaço da laranja, para aproveitamento como ração animal e para gerar pectato de cálcio no interior de diversas frutas e vegetais processados, com o objetivo de preservar ou aumentar sua firmeza (textura).

o bagaço é tratado com uma solução de hidróxido de cálcio, que ativa as enzimas nativas (pelo ajuste do pH e pela adição de cálcio), causando rápida desesterificação e formação de pectato de cálcio. Nesse processo, boa parte da água contida no bagaço é expulsa e pode ser facilmente removida por prensagem, reduzindo a quantidade de água que deverá ser retirada pelo custoso processo de secagem.

Processo semelhante é utilizado para gerar pectato de cálcio no interior de diversas frutas e vegetais processados, com o objetivo de preservar ou aumentar sua firmeza (textura). Em alguns casos, a atividade de pectinaesterases nativas não é suficiente para o efeito desejado e podem-se introduzir enzimas exógenas (em geral, pectinaesterases purificadas de *Aspergillus niger*) nas frutas íntegras ou em pedaços, por submersão em solução enzimática. A difusão/penetração das enzimas pode ser muito aumentada quando o processo é conduzido sob vácuo. Tal processo já foi aplicado com sucesso em morangos, maçãs e pêssegos em calda (autoclavados e misturados em iogurtes).

Pectinaesterase e poligalacturonase. Dentre os produtos de importância comercial, o que apresenta maior atividade de ambas as enzimas combinadas é o tomate. A presença dessas enzimas influencia significativamente a conservação pós-colheita e o processamento do fruto.

No caso do produto *in natura*, a atividade combinada de pectinaesterases e poligalacturonases nativas reduz a vida de prateleira da maior parte das variedades de tomate, por provocar rápido amolecimento do fruto (perda da textura desejável) e por aumentar sua susceptibilidade a danos mecânicos durante transporte e comercialização. Uma solução foi o desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas de tomate, produtoras de menores teores dessas enzimas e que também sintetizassem menos etileno que as variedades não modificadas.

Na obtenção de produtos de tomate, são utilizados dois tipos básicos de processamento, de acordo com o

Em tomates *in natura*, a atividade combinada de pectinaesterases e poligalacturonases nativas reduz a vida de prateleira da maior parte das variedades.

Hot Break – processo que provoca a inativação térmica das pectinases nativas do tomate – produtos viscosos e pouco concentrados.
Cold Break – processo que promove a atividade das pectinases nativas pelo uso de sua temperatura ótima – produtos altamente concentrados.

A adição de pectinases reduz a viscosidade e provoca precipitação das partículas de turvação.

efeito a ser provocado sobre a atividade das pectinases nativas:

Hot break (90°C). Processo que depende de inativação térmica das pectinases imediatamente após o despolpamento. Garante a manutenção do conteúdo de pectina da polpa, gerando pastas altamente viscosas aplicadas na produção de *ketchup*, sopas e molhos.

Cold break (40°C). Processo que depende de um período de repouso após o despolpamento, garantindo a atividade das enzimas nativas. Proporciona a obtenção de sucos pouco viscosos. Quando concentrados, os sucos são usados como flavorizantes e corantes, em produtos cuja consistência é garantida por outro ingrediente (amido, gomas, gelatina etc.). As pastas produzidas por esse processo, quando reconstituídas, não apresentam viscosidade característica do molho de tomate.

Enzimas exógenas

Clarificação de sucos de frutas. É a maior e mais antiga aplicação de pectinases comerciais. Após a extração, a maior parte dos sucos de frutas é turva e apresenta alta viscosidade. Em alguns sucos, como os de laranja e de *grapefruit*, por exemplo, a turbidez é desejada e deve ser preservada, porém os sucos de uva, maçã e pêra são comercializados clarificados e devem passar por um processo de filtração ou centrifugação para remoção da turbidez. A adição de pectinases reduz a viscosidade e provoca precipitação das partículas de turvação, facilitando sua remoção pelos processos de filtração e de centrifugação, aumentando o rendimento do suco clarificado e a vida útil de equipamentos, como filtros e *finishers*.

A turvação em sucos é causada basicamente por proteínas do citoplasma vegetal, carregadas positivamente no pH ácido dos sucos, envoltas por substância péctica de carga negativa. As partículas mantêm-se em suspensão pela repulsão de sua carga superficial (negativa). A degradação parcial da pectina dessas partículas permite a exposição do núcleo protéico (carga positiva), o que

possibilita a atração do núcleo de algumas partículas pela capa de outras. Essa atração acaba por gerar partículas de tamanho muito grande, que precipitam.

A viscosidade do suco é causada por pectina e hemicelulose dissolvidas (não comprometidas com as partículas protéicas). Quando elas são hidrolisadas a partículas menores (despolimerização), a viscosidade fica significativamente reduzida.

A clarificação e a redução da viscosidade podem ser alcançadas pelo uso combinado de pectinaesterases e poligalacturonases — indicado para todos os sucos e principalmente para o suco de uva, cuja pectina tem baixo teor de metoxilação — ou pela adição de pectinaliases — indicado basicamente para maçãs, cuja pectina é altamente esterificada. É importante notar que o pH do

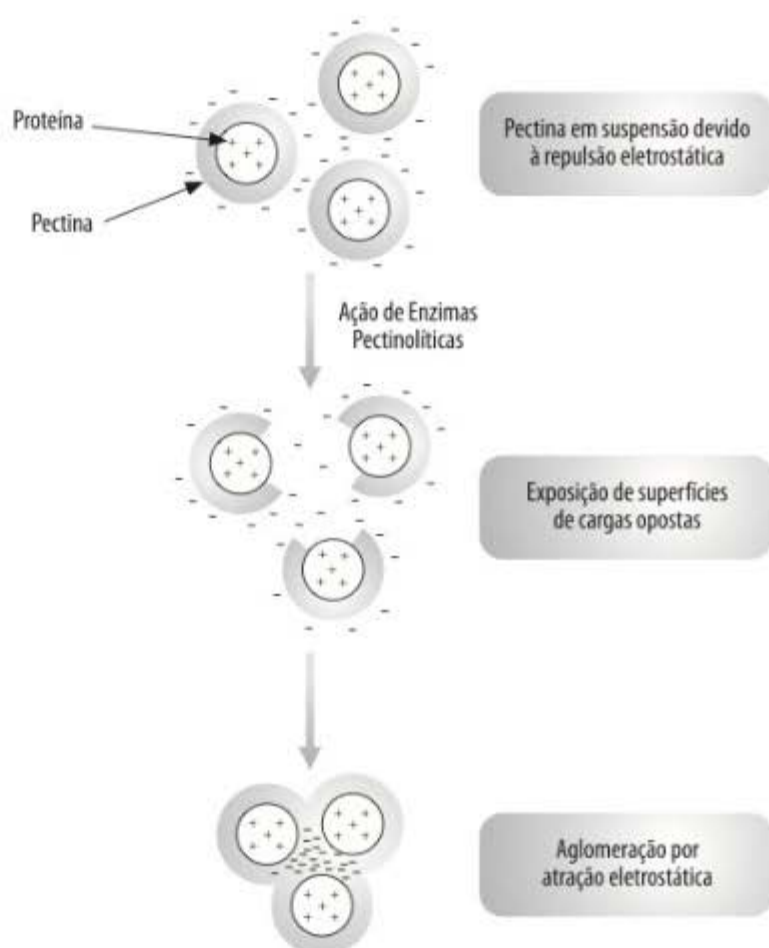


Figura 2.17 Turvação em sucos de frutas e sua clarificação por enzimas.

suco deve ser tal, que as partículas de proteína assumam carga positiva. Em sucos com pH artificialmente elevado, a ação das pectinases não apresenta efeito na remoção da turvação.

▼

A obtenção de um suco de fruta consiste na separação da parte líquida da polpa da fruta da sua parte sólida insolúvel. A adição de pectinases promove a hidrólise da pectina, gerando sucos menos viscosos, mais fáceis de extrair, melhorando as características de prensagem e aumentando em muitas vezes o rendimento. O uso de pectinases tem sido aplicado ainda na extração de óleos de diversos produtos.

Extração de sucos. A obtenção de um suco de fruta consiste na separação da parte líquida da polpa da fruta — formada basicamente pelo conteúdo vacuolar das células — da sua parte sólida insolúvel — os componentes das paredes celulares, principalmente celulose e protopectina. A separação, em geral, é alcançada por prensagem da polpa da fruta: nesse caso, a saída da parte líquida depende do rompimento mecânico das paredes e das membranas celulares. O uso de pectinases auxilia o processo, facilitando o rompimento das paredes e aumentando o rendimento da extração.

Algumas polpas de frutas, sobretudo as com alto conteúdo de pectina solúvel, são especialmente difíceis de prensar o que ocasiona muito baixo rendimento em suco. A adição de pectinases à polpa, nesses casos, promove a hidrólise da pectina, gerando sucos menos viscosos, mais fáceis de extrair, melhorando as características de prensagem e aumentando em muitas vezes o rendimento.

Em frutas vermelhas, a hidrólise de componentes da parede celular auxilia a liberação de pigmentos para o suco. Esse efeito é especialmente desejado na produção de vinho tinto, reduzindo o tempo de maceração da casca no mosto (necessário para a extração das antocianinas).

Nestes procedimentos a combinação de enzimas aplicada pode ser a mesma utilizada para clarificação, devendo, da mesma forma, ser levado em consideração o grau de esterificação da pectina da fruta em questão.

O uso de pectinases tem sido aplicado ainda na extração de óleos de diversos produtos: azeitonas, dendê, babaçu, coco etc.

Liquefação. É o processo de transformação da polpa em suco que independe de prensagem. A polpa é toda liquefeita pela hidrólise dos componentes da parede

▼

A liquefação consiste na hidrólise e solubilização das partes insolúveis da polpa, transformando-as em parte integrante do suco.

celular dos vegetais. Para que o processo seja eficiente, devem ser usadas em conjunto pectinases e celulases, que, devido ao sinergismo de suas atividades, são capazes de hidrolisar até 80% dos polissacarídeos presentes na polpa. O grau de hidrólise atingido — produção de sucos límpidos, turvos ou viscosos — é dependente do acesso das enzimas ao substrato e está principalmente relacionado com a presença e a concentração de lignina no produto. Sucos de mamão assim obtidos são totalmente límpidos, enquanto os de maçã são turvos e os de cenoura são viscosos.

A liquefação é um processo interessante sob diversos aspectos: aumenta o teor de sólidos do suco (que é de interesse para a indústria de sucos concentrados), reduz a próxima de zero a produção de resíduos (não há bagaço) e pode ser aplicado com sucesso em frutos que não se adaptam bem ao processo de extração convencional por prensagem (banana, manga, goiaba etc.). No entanto, sua aplicação não é muito difundida principalmente por problemas legais: sucos obtidos dessa forma não se encaixam no padrão de identidade da maioria dos países (principalmente na União Européia, onde o uso de celulases é proibido em produtos de frutas).

▼

Na maceração, o vegetal sofre adição de poligalacturonases ou pectato liases purificadas. Na ausência de pectinaesterases, a ação destas enzimas é bastante limitada, causando apenas a solubilização da lamela média.

Maceração. É o processo de hidrólise e de solubilização da lamela média dos tecidos vegetais, gerando polpas de frutas e vegetais que contêm células intactas. As polpas, aplicadas na produção de alimentos infantis, pudins, iogurtes e purês, apresentam uma série de vantagens sobre os produtos convencionais (polpas homogeneizadas mecanicamente): ausência de reações degenerativas — como escurecimento enzimático e destruição de aromas e vitaminas —, causadas pela ação de enzimas endógenas liberadas pelo rompimento celular; manutenção de alto conteúdo de fibras — apenas a lamela média é hidrolisada, as paredes celulares permanecem como parte integrante do produto.

Para obtenção das polpas, o vegetal sofre uma desintegração mecânica suave e são-lhe adicionadas poligalacturonases ou pectatolases purificadas. Na ausência

de pectinaesterases, a ação dessas enzimas é bastante limitada, causando apenas a solubilização da lamela média. Ocorre, assim, a perda de coesão entre as células — formação de polpa —, além da geração de oligômeros, que contribuem para dar cremosidade ao produto.

Esse processo é aplicado na produção de purê de cenoura para formulação de alimentos infantis e na produção de purê de batata instantâneo. Nesse caso, o amido deve ser previamente gelatinizado e o uso de maceração impede que ele vaze para fora das células, evitando a textura grudenta no produto reconstituído.

Descascamento enzimático. Consiste na hidrólise do albedo de frutas cítricas (principalmente laranjas e *grapefruit*) entre a casca e a polpa e entre os segmentos da polpa, de modo a separar a fruta em gomos. O processo depende da aplicação de pectinases, sob pressão ou a vácuo, nas frutas íntegras. Após o tempo de hidrólise, a casca deve ser retirada manualmente. Os gomos da fruta são então resfriados e embalados para comercialização como produtos minimamente processados. Esse tipo de produto é bastante difundido nos EUA e no Japão.

Liberação de precursores de aroma em vinhos. Alcoóis monoterpênicos são consideradas substâncias de extrema importância na formação do aroma de diversos tipos de vinho. Sua liberação depende da hidrólise dos terpenos glicosilados presentes no mosto fermentado e que é atingida pela ação de β -glicosidases e hemicelulases (arabinosidase, ramnosidase etc.). Essas enzimas devem ser adicionadas ao mosto logo após a fermentação, para agir por 15 dias a 1 mês. A duração do tratamento deve ser determinada (sensorialmente) por provador especializado. Uma vez atingido o aroma desejado, ao mosto deve ser adicionado bentonita (auxiliar de clarificação/filtração), que interrompe a atividade enzimática.

► Métodos de detecção da atividade

A atividade das pectinases é determinada sobre soluções de ácido péctico ou ácido pectínico, de acordo com

a enzima em estudo. São parâmetros a serem determinados: a perda de viscosidade da solução e o surgimento de grupos redutores no meio reacional. A combinação dos dois métodos de avaliação permite verificar se a enzima em questão tem padrão endo- ou exo- de atividade. A atividade de hidrolases e liases pode ser diferenciada por espectrofotometria de luz UV, uma vez que a dupla ligação formada por liases absorve fortemente a 235nm.

A atividade de celulase pode ser determinada sobre celulose insolúvel (utiliza-se um pedaço de papel-filtro como substrato) ou sobre celulose modificada (carboximetil-celulose). Em ambos os casos, após a paralisação da reação, o meio deve ser centrifugado e o sobrenadante avaliado quanto ao surgimento de açúcares redutores.

► Lactases

Lactases ou β -galactosidases (EC 3.2.1.23.) são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo β que envolvem galactoses e arabinoses, sendo a reação com esta última bem mais lenta. Seu principal substrato é a lactose, açúcar típico do leite, mas também estão envolvidas na modificação de gomas e de hemiceluloses, o que explica sua produção por diversos vegetais. Industrialmente são aplicadas lactases de origem microbiana para a hidrólise da lactose do leite e do soro, gerando glicose e galactose, e na produção de galactoligossacarídeos.

► Substrato

A lactose é o dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma unidade de galactose, ligadas entre si por ligação glicosídica do tipo β -1,4. É o carboidrato dominante no leite e representa cerca de 5% do leite bovino e até 7% do leite humano. É um açúcar pouco solúvel, cristaliza-se em concentrações superiores a 18% (enquanto a sacarose é solúvel em concentrações de até 64%) e forma cristais “pontudos” capazes de provocar a sensação bucal de arenosidade (quando maiores de 20 μ m). A lactose é muito pouco doce (apenas 16% da

▼
 β -galactosidases são enzimas capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo β envolvendo galactoses e arabinoses.

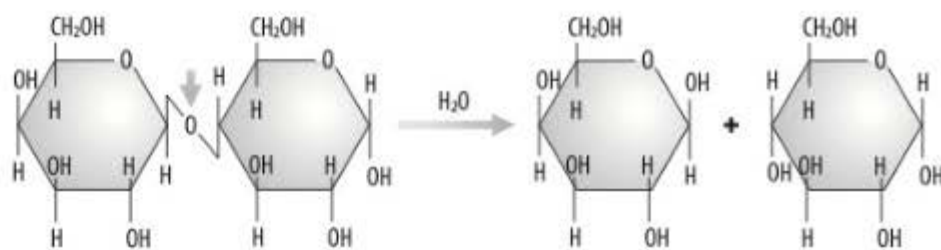


Figura 2.18 Ação da lactase sobre a lactose.

A lactose é o dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma unidade de galactose ligadas entre si por ligação glicosídica do tipo β -1,4; altas concentrações de lactose podem gerar defeitos em produtos desidratados, congelados e concentrados à base de leite.

doçura da sacarose) e altamente higroscópica, podendo causar empedramento em produtos lácteos em pó. Devido a essas características, altas concentrações de lactose podem gerar defeitos em produtos desidratados, congelados e concentrados à base de leite.

► Fontes e principais características

Lactases são produzidas no intestino de mamíferos; sua maior concentração é atingida logo após o nascimento. Na maioria das populações, a concentração de lactase cai drasticamente na fase adulta (em geral já após os 3 anos de idade), gerando dificuldade de hidrólise da lactose ingerida. Apenas populações do norte/leste da Europa e algumas tribos africanas são capazes de manter a produção de lactase no intestino satisfatória até a idade adulta. O acúmulo de lactose não digerida no intestino permite a multiplicação de microrganismos e leva à produção de gases e à diarreia (favorecida pela desidratação osmótica no local). Embora esses distúrbios possam ser minimizados pelo consumo constante de pequenas quantidades de lactose, acredita-se que a ingestão de produtos lácteos, isentos desse açúcar, favoreça a absorção dos demais nutrientes do alimento. É importante ressaltar que uma pequena fração das crianças no mundo nasce com intolerância à lactose, causada pela inabilidade de digerir a lactose (insuficiente produção de lactase) ou pela dificuldade de metabolizar a galactose. A lactase humana é secretada pelas células do jejuno (no intestino delgado) e tem ótima atividade em pH = 6,0 e em temperatura de 30 a 40°C.

Vários vegetais são produtores de lactases; entre eles, destacam-se pêssego, damasco, café e amêndoa. A lactase da amêndoa, conhecida como emulsina, apresenta também atividade de glicosidase. Lactases de origem vegetal não são comercializadas para uso industrial.

Atualmente as lactases de uso comercial são de origem microbiana, sendo as principais fontes os seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Candida pseudotropicalis* e *Kluyveromyces lactis*. A lactase microbiana mais conhecida e estudada é a produzida por *Escherichia coli*, uma vez que o gene promotor dessa proteína é largamente utilizado em experimentos de clonagem. Seu uso em alimentos, porém, não é permitido (em virtude da possibilidade de patogenicidade) e seu interesse para a indústria de alimentos restringe-se à quantificação enzimática de lactose. De uma forma geral, pode-se dizer que enzimas de origem fúngica têm pH ótimo ácido (de 2,5 a 4,5), sendo indicadas para hidrólise de lactose do soro; enquanto lactases de origem bacteriana têm pH ótimo em torno de 7,0 e as produzidas por leveduras têm ótima atividade em pH de 6,0 a 7,0, sendo, portanto, indicadas para uso no leite (pH em torno de 6,5). Lactases de fungos filamentosos apresentam ótima atividade em temperatura em torno de 50°C, enquanto as produzidas por leveduras têm temperatura ótima de 30 a 40°C.

Lactases apresentam ainda atividade de transferase, podendo ligar uma unidade de galactose à outra unidade de galactose livre por uma ligação β -1,6 (gerando o dissacarídeo lactobiose), à galactose pertencente a uma

Lactases de fungos filamentosos têm pH ótimo ácido (entre 2,5 e 4,5), sendo indicadas para hidrólise de lactose do soro, e as produzidas por leveduras têm ótima atividade em pH entre 6,0 e 7,0 sendo, portanto, indicadas para uso no leite.

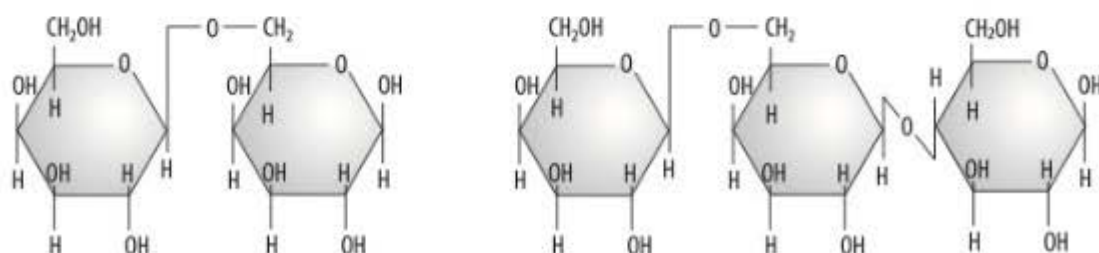


Figura 2.19 Lactobiose e lactotriose.

lactose (gerando o trissacarídeo lactotriose) ou, ainda, a uma lactobiose (gerando o trissacarídeo galactotriose).

► Aplicação industrial

Produtos para consumidores intolerantes à lactose

Ingestão ou aplicação doméstica da enzima. Existem no mercado cápsulas que contêm lactase, para serem ingeridas por indivíduos intolerantes à lactose. Aumentam a atividade dessa enzima no intestino, aliviando os sintomas causados pelo acúmulo do açúcar. Alternativamente, o consumidor pode adicionar ao leite ou produto lácteo um preparado enzimático em pó ou líquido, antes do consumo, com o objetivo de hidrolisar a lactose e evitar os danos associados à intolerância.

Leites com baixo teor de lactose. São encontrados no mercado leites, principalmente do tipo UHT, com reduzido teor de lactose, previamente tratados com lactase, destinados a consumidores portadores de intolerância. Entretanto, esses produtos são consideravelmente mais caros que os leites tradicionais. Como estratégia para redução do preço desses produtos, uma empresa na Suécia tem aplicado quantidades extremamente reduzidas da enzima aos produtos de longa-vida, de modo que, ao longo de extenso período de armazenamento, seja possível atingir alto grau de hidrólise a custo reduzido.

Vale ressaltar que a hidrólise da lactose aumenta a doçura do leite, uma vez que a mistura de glicose e galactose é cerca de 4 a 5 vezes mais doce do que a lactose.

Para o tratamento de leites, seja para uso industrial ou doméstico, a lactase comercial mais indicada é a produzida por *Kluyveromyces lactis*, em virtude de seu pH ótimo de ação.

Uma destinação alternativa para o soro de queijo, em diversos países, é servir como alimentação animal. No entanto, o alto teor de lactose desse subproduto limita as quantidades de administração sob pena de interferir negativamente no ganho de peso do animal. O tratamen-

to enzimático do soro para esse fim é economicamente inviável, porém uma possibilidade é o uso de leveduras fermentadoras de lactose (p. ex., *Kluyveromyces fragilis*). O produto obtido, além de reduzido teor de lactose, apresenta alto teor de proteína microbiana.

Pré-tratamento do leite para obtenção de diversos produtos

logurte. A hidrólise da lactose em leites a serem fermentados aumenta a doçura do produto final sem aumentar o valor calórico. Além disso, o uso de leites tratados com lactase pode reduzir o tempo de fermentação, melhorar a textura e reduzir a dessora. Alguns autores relatam o surgimento de *off-flavor* nesses produtos.

Queijo. O pré-tratamento do leite para produção de queijo tipo Cheddar parece reduzir o tempo de produção e, principalmente, o de maturação. Alguns autores acreditam que esses efeitos devam-se não à lactase, mas à presença de proteases contaminantes no preparado enzimático comercial.

Produtos de panificação. O leite em pó, previamente hidrolisado, fornece glicose para fermentação dos produtos de panificação, enquanto a galactose, não fermentável, contribui para a formação da cor e do aroma pela reação de Maillard.

Leite congelado. O congelamento não é um método muito aplicado de conservação de leite bovino, pois provoca desestabilização da emulsão (com a destruição das micelas de caseína e rompimento dos glóbulos de gordura). Boa parte desses efeitos é creditada à formação de cristais de lactose durante o congelamento. Portanto, leites tratados com lactase podem ser congelados com significativa redução de danos.

Doce de leite, leite condensado e sorvete. Nesses produtos, por causa da concentração ou da temperatura, a lactose tende a cristalizar-se. A formação desses cristais gera arenosidade, sensação bucal que leva à rejeição do consumidor. O uso de leites tratados com lactase evita essa

formação de arenosidade. É importante destacar que o controle do processo, na obtenção desses produtos com leite natural, é capaz de evitar a cristalização indesejada da lactose e que ela ocorre, em geral, como consequência de falha no processamento.

Produção de xarope de glicose-galactose

▼
O xarope de glicose-galactose é adicionado à formulação de doce de leite, leite condensado, sorvete e sobremesas de leite congeladas, para evitar a cristalização da lactose, e reduz a necessidade de adição de outro edulcorante na formulação.

O soro de queijo já foi considerado um resíduo altamente poluente da indústria queijeira. Atualmente, no entanto, devido principalmente à alta qualidade nutricional das proteínas do soro, boa parte desse subproduto é totalmente aproveitada.

O processo que garante maior aproveitamento comercial do soro envolve uma etapa de ultrafiltração, na qual a maior parte das proteínas presentes é retida e posteriormente transformada em pó (por secagem em *spray-dryer*, p. ex.). Esse produto é utilizado na suplementação de sólidos para produção de iogurte (melhoria da textura e redução da dessora) e como ingrediente em diversos produtos lácteos e de panificação (substituindo os sólidos do leite).

O permeado da ultrafiltração do soro contém principalmente lactose (que corresponde a até 75% dos sólidos do soro) e sais. Estes últimos podem ser removidos por colunas de troca iônica semelhantes às utilizadas na dessalinização de água. O restante, basicamente lactose, é utilizado na produção de xarope de glicose-galactose. Para tanto, a solução de lactose é tratada com lactase fúngica, imobilizada, que pode atingir de 70 a 90% de hidrólise, gerando uma solução com até 80% da doçura da sacarose. Essa solução é, então, concentrada, formando uma solução viscosa ou xarope. Esse xarope pode ser adicionado à formulação de doce de leite, leite condensado, sorvete e sobremesas de leite congeladas, para evitar a cristalização da lactose presente nesses produtos. Além dessa propriedade, a adição do xarope de glicose-galactose reduz a necessidade de adição de sacarose ou de outro edulcorante na formulação.

Uma alternativa de baixo custo é a dessalinização do soro integral, seu tratamento com lactases e posterior concentração. O produto obtido, rico em proteínas, pode ser utilizado como ingrediente, substituto do leite, em diversas formulações.

O poder edulcorante do xarope de glicose-galactose pode ser muito aumentado pela transformação da glicose em frutose por isomerização ou pela transformação de lactose em lactulose por tratamento alcalino da lactose. A lactulose é o principal produto de ação pré-biótica comercializado no Japão.

Uma alternativa a esse processo é a transformação de lactose em lactulose (dissacarídeo de galactose e frutose), alcançada por tratamento alcalino da lactose. A lactulose pode, posteriormente, ser hidrolisada a galactose e a frutose por lactases de *Kluyveromyces lactis* comerciais (porém não pela lactase humana). É importante mencionar que a lactulose é o principal produto de ação pré-biótica comercializado no Japão, onde, em 1995, foram produzidas cerca de 20.000 toneladas. Além de ser um ingrediente funcional, a lactulose é utilizada ainda em diversos medicamentos contra constipação intestinal.

Produção de galactoligosacarídeos

Os produtos gerados pela ação de transferase das β -galactosidases são conhecidos como galactoligosacarídeos. Esses compostos, por não serem digeridos no trato digestório humano, são capazes de atingir o cólon sem terem sofrido alterações. Nesse local, a presença dos galactoligosacarídeos é capaz de favorecer o crescimento de populações microbianas benéficas (como *Bifidobacterium*) em detrimento de bactérias do tipo putrefativas (da família Enterobacteriaceae, por exemplo) o que os caracteriza como substâncias pré-bióticas. Galactoligosacarídeos são produzidos, por via enzimática, em larga escala, por empresas japonesas e holandesas, com uso de lactases. No Japão e na Europa, os galactoligosacarídeos são os principais ingredientes pré-bióticos utilizados (só perdendo para a lactulose) e sua produção mundial em 1995 era estimada em 15.000 toneladas.

O poder edulcorante do xarope de glicose-galactose pode ser muito aumentado pela transformação da glicose em frutose mediante isomerização ou pela transformação de lactose em lactulose por tratamento alcalino da lactose. A lactulose é o principal produto de ação pré-biótica comercializado no Japão.

São denominadas substâncias pré-bióticas aquelas que não são digeridas pelo trato digestivo humano (fibras alimentares) e que, no intestino, promovem o aumento da população de microrganismos benéficos, em detrimento de outros considerados prejudiciais.

Altas concentrações de galactoligossacarídeos em produtos lácteos podem levar a distúrbios intestinais, principalmente flatulência.

A presença de altas concentrações de galactoligossacarídeos (derivadas da ação de transferase das lactases) em leites ou produtos lácteos, tratados enzimaticamente, pode levar a distúrbios intestinais, principalmente flatulência.

► Métodos de detecção da atividade

A atividade de β -galactosidase não deve ser avaliada com base em ensaios de geração de açúcares redutores, uma vez que o substrato da enzima — lactose — é um dissacarídeo redutor. Um método possível é o uso de *kits* enzimáticos para determinação da glicose liberada, após o término da reação. Uma alternativa bastante interessante é o uso de substratos sintéticos do tipo *orto*- — ou *para*- — nitrofenil-galactose. Esses substratos são prontamente hidrolisados pela enzima (em geral até mais rapidamente que a lactose), liberando galactose e *orto*- — ou *para*- — nitrofenol, compostos com absorção máxima em torno de 400nm, que podem ser quantificados por espectrofotometria.

A atividade de transferase da enzima pode ser avaliada qualitativamente por cromatografia em papel do produto de reação.

► Invertases

β -frutofuranosidases são enzimas capazes de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose. Devido à sua atividade de transferases, invertases microbianas e vegetais são utilizadas na obtenção de oligossacarídeos funcionais (bifidogênicos).

Invertases ou β -frutofuranosidases (EC 3.2.1.26.) são enzimas capazes de hidrolisar a sacarose em glicose e em frutose. Seu nome comum — invertase — deve-se ao fato de que a hidrólise da sacarose leva à inversão da rotação óptica do meio reacional, basicamente em consequência do surgimento de frutose, quando observado em polarímetro.

O produto da hidrólise da sacarose, o xarope de glicose-frutose, conhecido como “açúcar invertido”, apresenta diversas características interessantes em relação ao xarope de sacarose: maior poder edulcorante (devido à presença da frutose), maior possibilidade de concentração (os monossacarídeos formados são mais solúveis que

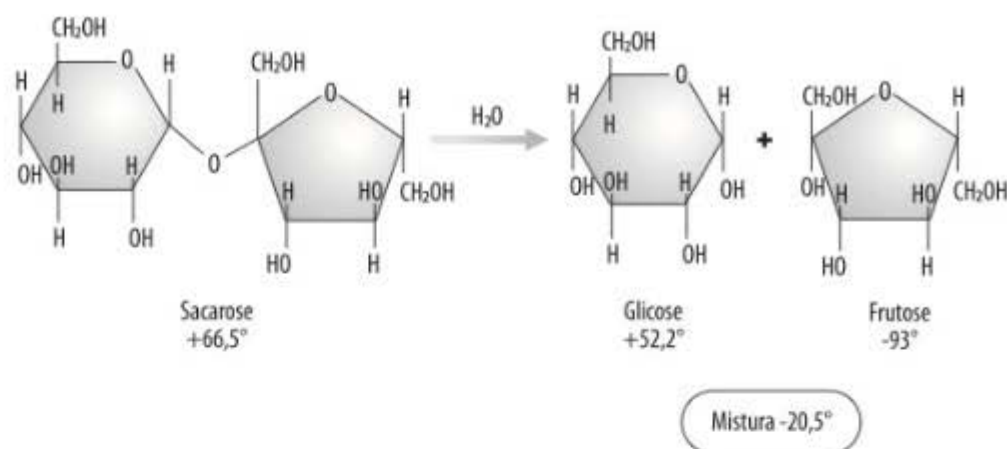


Figura 2.20 Reação de hidrólise da sacarose e rotação óptica de substrato e produtos.

o dissacarídeo original), ponto de ebulição mais alto e ponto de congelamento mais baixo (em virtude da maior pressão osmótica do produto) e várias aplicações na indústria de alimentos. No entanto, a obtenção de açúcar invertido é mais facilmente alcançada pela aplicação de resinas catalíticas (hidrólise ácida), sendo a hidrólise enzimática pouco utilizada para esse fim. Atualmente, são utilizadas invertases microbianas, devido à sua atividade de transferases, na obtenção de oligossacarídeos funcionais (bifidogênicos).

► Substrato

A sacarose é um dissacarídeo não-redutor, formado por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose (frutofuranose), ligadas entre si por uma ligação glicosídica β -1,2. É o principal açúcar comercializado no mundo e suas maiores fontes são a cana-de-açúcar e a beterraba. A sacarose é considerada o padrão de doçura na indústria de alimentos, de tal forma que o poder edulcorante de outras substâncias é determinado em relação a ela.

► Fontes e principais características

Invertases são enzimas bastante distribuídas na Natureza, sendo produzidas por animais, vegetais e microrganismos. Industrialmente as invertases mais importantes são as produzidas por leveduras (*Saccharomyces* sp. e

A sacarose é um dissacarídeo não redutor formado por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose ligadas entre si por uma ligação glicosídica β -1,2; é considerada o padrão de doçura, sendo o poder edulcorante de outras substâncias determinado em relação a ela.

Kluyveromyces sp., principalmente), embora invertases de fungos filamentosos (*Aspergillus* sp.) e de origem vegetal (aspargo, beterraba, cebola, chicória, entre outras) venham sendo utilizadas na obtenção de frutoligossacarídeos.

Leveduras produzem diferentes tipos de invertases: intracelulares, ligadas à parede, e, mais raramente, extracelulares. As enzimas ligadas à parede apresentam uma grande fração glicídica através da qual acredita-se que se liguem a mananas da parede celular. Apresentam pH ótimo de 4,0 a 5,5, sendo inativadas em meios com pH superior a 6,0 e inferior a 3,0. Sua temperatura ótima de atuação é 55°C para soluções diluídas de sacarose e de 65 a 70°C para soluções com concentração superior a 10%. Soluções acima de 20% de sacarose apresentam taxas decrescentes de hidrólise em virtude da reduzida disponibilidade de água no meio reacional.

Há ainda um segundo tipo de enzimas capaz de hidrolisar a sacarose: as α -glicosidases. Essas enzimas reconhecem a ligação glicosídica ao se ligarem à glicose do substrato, enquanto invertases se ligam à frutose. Pela diferença em seu modo de ação, é possível verificar-se a ocorrência de α -glicosidase ou de β -frutofuranosidase ao se aplicarem substratos específicos: os trissacarídeos rafinose e melesitose. Por existir um terceiro componente na molécula, dependendo da sua localização, uma das duas enzimas é incapaz de promover a reação de hidrólise. Assim, a β -frutofuranosidase é capaz de hidrolisar a rafinose, mas não a melesitose, e a α -glicosidase é capaz de hidrolisar a melesitose, mas não a rafinose.

As β -frutofuranosidases são capazes de hidrolisar a rafinose mas não a melesitose, e as α -glicosidases são capazes de hidrolisar a melesitose mas não a rafinose.

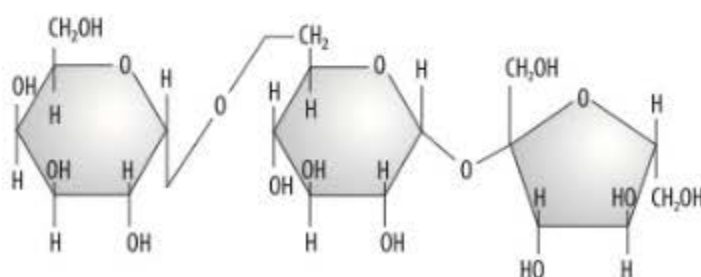


Figura 2.21 Estrutura da rafinose.

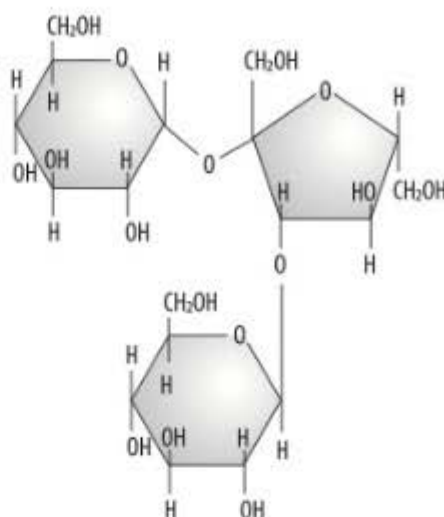


Figura 2.22 Estrutura da melezitose.

Além da atividade hidrolítica, invertases podem apresentar atividade de transferases, sendo capazes de remover a unidade de frutose do substrato (sacarose) e de a ligar a diferentes aceptores em diferentes posições. O tipo preferencial de aceptor e de ligação formada são dependentes do meio reacional e, principalmente, da fonte da enzima.

► Aplicação industrial

Como mencionado anteriormente, o uso de invertases na obtenção de açúcar invertido não é muito difundido, uma vez que é possível obter-se o mesmo resultado com aplicação de resinas catalíticas. É importante observar que a aplicação de tais resinas só é possível uma vez que o substrato (solução de sacarose) é bastante puro. Em casos semelhantes, como na obtenção de xarope de glicose e galactose a partir de lactose do soro, por exemplo, o uso de resinas é muito prejudicado por outros componentes existentes no soro, tornando necessária a hidrólise enzimática. Embora pouco aplicada, a hidrólise enzimática de sacarose é um processo bastante viável e eficiente, podendo ser utilizadas enzimas imobilizadas ou mesmo células de leveduras.

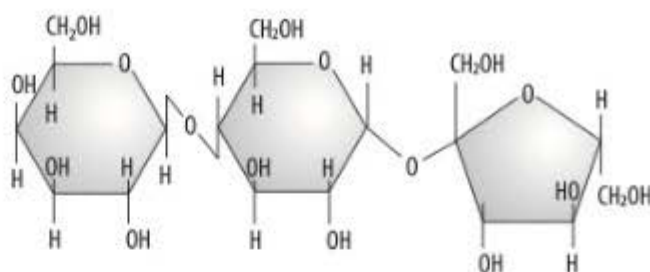


Figura 2.23 Estrutura da lactossacarose.

Obtenção de oligossacarídeos funcionais

A principal aplicação industrial de invertases depende de sua atividade como transferases. Os oligossacarídeos obtidos dessa forma estão entre os principais ingredientes bifidogênicos comercializados.

Lactossacarose. Obtida pela transferência de uma unidade de frutose para o acceptor lactose (a frutose se liga à glicose da lactose por uma ligação β -1,2), formando um trissacarídeo.

Frutoligossacarídeos. Produzidos por diversas empresas européias e japonesas, em 1995 foram comercializadas cerca de 12.000 toneladas desses oligossacarídeos. Existem três grupos diferentes de frutoligossacarídeos, como veremos *a seguir*.

Obtidos por transfrutosilação pela ação de invertases:

A) Formados por unidades de sacarose ligadas por ligação β -1,2 a 1, 2 ou 3 unidades de frutose, gera 1-questose (trissacarídeo), 1-nistose (tetrassacarídeo) e 1-frutofuranosil-nistose (pentassacarídeo). Misturas que contêm diferentes proporções desses sacarídeos, além de resíduos de sacarose, glicose e frutose (traços), são comercializadas no Japão com as marcas registradas "Neosugar" e "Meiologo". O processo pode ser conduzido com uso de invertase de *Aspergillus niger* (pH = 5,0, T = 40°C por 72 h), partindo-se de uma solução a 50% de sacarose, o que gera cerca de 15% de 1-questose, 33% de nistose, 7% de frutofuranosil-nistose, 30% de glicose e 5% de sacarose.

Frutoligossacarídeos do tipo GFx (1 Glicose e x Frutoses) são obtidos por transfrutosilação da sacarose.

Frutoligossacarídeos do tipo Fx (x unidades de frutose) são obtidos por hidrólise de inulina.

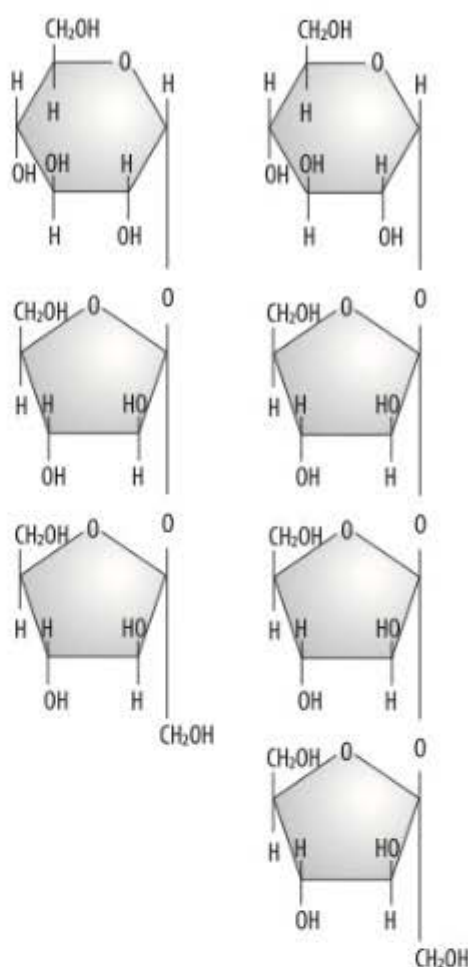


Figura 2.24 Estruturas da 1-questose e da 1-nistose.

B) Em casos mais raros algumas invertases são capazes de sintetizar 6-questose (trissacarídeo formado por uma unidade de frutose ligada ao carbono 6 da frutose pertencente à uma sacarose) e neoquestose. No caso da neoquestose, a frutose transferida se liga à glicose da sacarose, ao contrário do que acontece nos outros oligossacarídeos, formando com esta uma ligação β -2,6.

Obtidos por hidrólise de frutanas: alguns vegetais acumulam polímeros de frutose chamados de inulina. Diversas empresas produzem frutoligossacarídeos a partir de inulina, por hidrólise, aplicando a enzima específica inulinase. A diferença desses oligossacarídeos para os obtidos por transfrutosilação da sacarose é que eles não possuem unidades de glicose em sua estrutura. Comer-

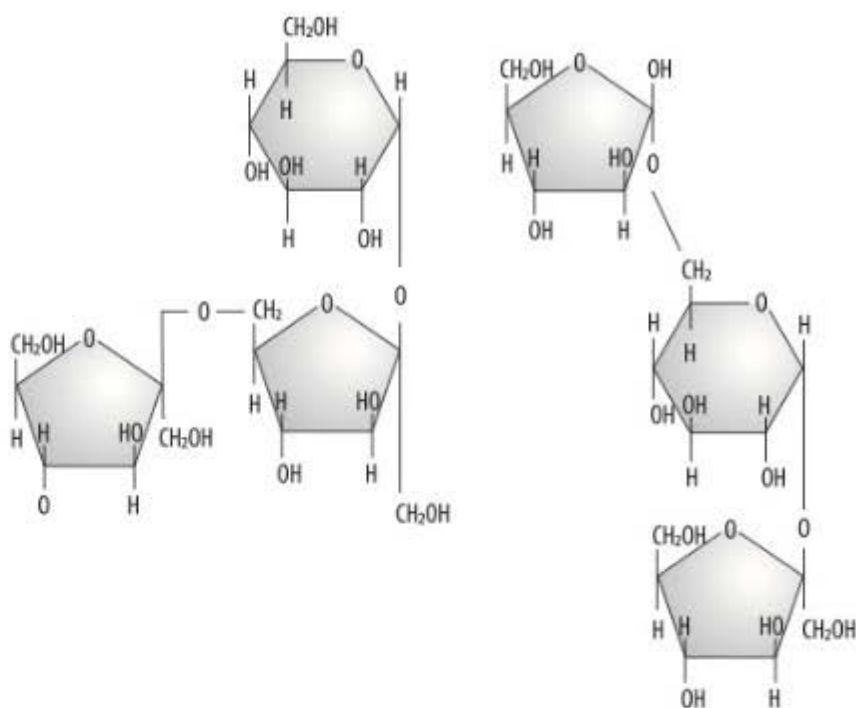


Figura 2.25 Estruturas da 6-questose e da neoquestose.

cialmente são aplicadas inulinases de *Kluyveromyces marxianus* (pH = 5,0, T = 50°C).

► Métodos de detecção da atividade

A atividade hidrolítica de β -frutofuranosidasas pode ser determinada de diversas maneiras:

- 1) por acompanhamento da inversão de rotação óptica do meio reacional, em polarímetro;
- 2) por quantificação da glicose liberada durante a reação, utilizando *kits* de determinação de glicose — método que tem a vantagem de detectar toda a atividade hidrolítica, independente de haver posterior transferência de unidades de frutose para outros aceptores;
- 3) por quantificação dos açúcares redutores liberados — método bastante prático uma vez que a sacarose é um açúcar não-redutor.

Atividade de transferase deve ser acompanhada pela detecção dos oligossacarídios formados, o que pode ser facilmente alcançado por cromatografia em papel dos produtos de reação (detecção qualitativa).

► Outras carboidrases de interesse em alimentos

► Quitinases, quitosanases e lisozima

Há três tipos diferentes de enzimas quitinolíticas:

Quitinase A, que é uma endoquitinase que rompe as ligações entre as unidades de N-acetil-glicosamina de forma desordenada, gerando uma mistura de quitoligos-sacarídeos de diferentes pesos moleculares;

Quitinase B, que é uma exoquitinase e age a partir da extremidade não-redutora do polissacarídeo, liberando sempre unidades de quitobiose (2 unidades de N-acetil-glicosamina);

N-acetil-glicosaminidase, capaz de hidrolisar poli- e oligossacarídeos (inclusive a quitobiose) de quitina, gerando sempre unidades de N-acetil-glicosamina.

Geralmente, microrganismos produtores de quitinase produzem as três variantes da enzima em diferentes proporções, de acordo com a espécie. Na Natureza, quitinases bacterianas desempenham funções relacionadas com o parasitismo ou a nutrição do organismo, enquanto em fungos, protozoários e invertebrados, elas estão também envolvidas na morfogênese. Em vegetais e vertebrados, a atividade quitinolítica está relacionada com os mecanismos de defesa contra patógenos, atividade também recentemente identificada em humanos.

Outra enzima capaz de hidrolisar a quitina é a *lisozima*. Enzima específica para peptidioglicanos formadores da parede celular de bactérias Gram-positivas, cujo esqueleto básico é composto por quitina modificada (contendo peptídios ligados à posição 3 da N-acetil-glicosamina) e é encontrada na saliva dos mamíferos, na clara de ovo (sua principal fonte comercial) e em sementes (durante o processo de germinação).

Quitosanases são produzidas por microrganismos e vegetais, em menor escala que as quitinases. Há dois tipos de enzimas capazes de hidrolisar quitosana:

Quitinases hidrolisam ligações do tipo β -1,4 entre unidades de N-acetil-glicosamina. Lisozima é a hidrolase que rompe ligações β -1,4 entre as unidades de N-acetil-glicosamina formadoras da mureína – glicopeptídeo característico da parede celular de bactérias. Quitosanases hidrolisam ligações do tipo β -1,4 entre unidades de glicosamina.

Endoquitosanase: rompe as ligações β -1,4 entre unidades de glicosamina, de forma desordenada dentro do polímero, gerando quitosanoligossacarídeos;

Exoquitosanase: rompe as ligações β -1,4 de forma organizada, a partir da extremidade da molécula, gerando principalmente quitosanobiose.

► Substrato

A **quitina** é um polímero constituído de unidades de N-acetil-glicosamina, ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4. A quitina é, depois da celulose, o polímero mais abundante no planeta. Ela é o constituinte principal do exoesqueleto de crustáceos e insetos e está presente na parede celular de fungos e bactérias.

A **quitosana** é um polímero constituído por unidades de glicosamina, ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4. É obtida por desacetilação da quitina (método químico ou enzimático — uso de quitina-desacetilases), mas é também produzida por algumas espécies de fungos filamentosos, podendo ser comercialmente obtida do micélio.

► Aplicação industrial

Complexos quitinolíticos ricos em quitinase B e N-acetil-glicosaminidase são utilizados na obtenção de N-acetil-glicosamina, ingrediente ativo em fármacos an-

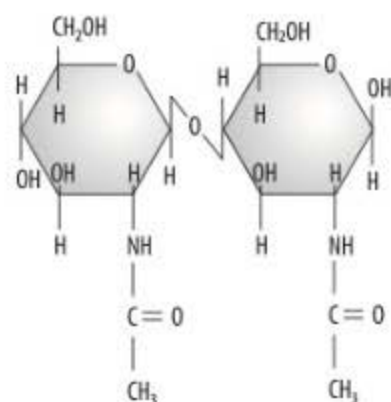


Figura 2.26 Quitobiose.

A quitina é um polímero constituído de unidades de N-acetil-glicosamina ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4 e é, depois da celulose, o polímero mais abundante do planeta. A quitosana é um polímero constituído por unidades de glicosamina ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4.

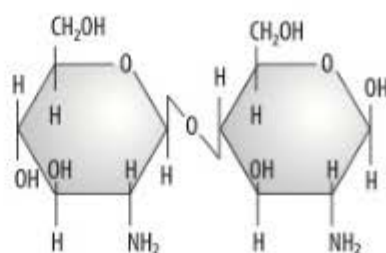


Figura 2.27 Quitosanobiose.

tiinflamatórios indicados contra artrite, colite ulcerativa e outros distúrbios gastrintestinais. Sua administração oral é bastante favorecida por seu sabor adocicado. A N-acetilglicosamina pode ainda ser aplicada como fonte de nitrogênio e de carbono para diversas fermentações.

O uso de quitinase A favorece a obtenção de quitoligossacarídeos, atualmente comercializados para diversos fins (principalmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia) por companhias japonesas. Entre as propriedades funcionais comprovadamente atribuídas aos quitoligossacarídeos está a ação antitumor (*in vitro*) dos compostos que contêm de 6 a 7 unidades monoméricas. Segundo estudos realizados, sacarídeos com grau de polimerização de 2 a 8 apresentaram atividade prebiótica para os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* superior a de frutoligossacarídeos, substâncias com atividade vastamente reconhecida.

É importante notar que a produção de N-acetilglicosamina e mesmo de quitoligossacarídeos pode ser alcançada por hidrólise ácida, com uso de HCl concentrado. Entretanto, o processo químico, além de ser de alto custo e gerar subprodutos indesejados e efluentes de difícil tratamento, apresenta grande dificuldade para ser controlado, de modo a se obter um produto final com as características desejadas para diferentes aplicações.

A aplicação de quitosanoligossacarídeos como ingredientes funcionais em alimentos tem os mesmos objetivos que a aplicação de derivados de quitina e, em geral, com melhores resultados: as ações pré-biótica e antitumoral de oligossacarídeos de quitosana são mais eficientes e

Quito- e quitosanoligossacarídeos apresentam ação antitumor, pré-biótica e de modulação do sistema imunológico além de ação antiinflamatória.

comprovadas que as da quitina, e esses compostos ainda apresentam ação antiolesterolêmica e de modulação do sistema imunológico.

Mais recentemente, as enzimas acima citadas, principalmente quitinases e lisozimas, vêm sendo testadas como possíveis conservantes de alimentos. Dada às suas capacidades de romper a parede celular de diversos microrganismos, essas enzimas apresentam potencial para impedir o estabelecimento e a multiplicação de organismos deteriorantes em produtos alimentícios. Lisozimas são usadas, desde a década de 1970, em queijos, para controlar o crescimento de bactérias propiônicas indesejadas. Atualmente, a maior dificuldade para a aplicação reside na alta concentração de enzimas necessária para o efeito desejado. Diferentes formas de aplicação, como, por exemplo, enzimas imobilizadas em filmes comestíveis, vêm sendo avaliadas para sanar o problema.

► Métodos de detecção da atividade

Como acontece com diversas carboidrases, a atividade de quitinases e quitosanases pode ser medida pela liberação de unidades redutoras do substrato polimérico (quitina ou quitosana). Entretanto, os métodos mais aplicados para quantificação de açúcares redutores não são indicados para medida de N-acetil-glicosamina por não fornecerem respostas lineares. Os agentes cromogênicos, como dimetil-aminobenzaldeído ou MBHT, garantem resultados mais precisos e confiáveis.

► Dextrana sacarase e dextranase

A dextrana é um polissacarídeo, produzido por microrganismos e formado por unidades de glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas α -1,6. Sua produção depende da enzima dextrana-sacarase, uma glicosiltransferase capaz de hidrolisar sacarose (seu único substrato) e transferir uma unidade de glicose para diferentes aceptores (glicose, maltose e pequenos oligossacarídeos de dextrana), sintetizando o polímero. Industrialmente

Quitinases e lisozimas vêm sendo testadas como possíveis conservantes de alimentos. Por sua capacidade de romper a parede celular de microrganismos, estas enzimas apresentam potencial para impedir o estabelecimento e a multiplicação de organismos deteriorantes em produtos alimentícios.

A dextrana é um polissacarídeo formado por unidades de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas α -1,6. Sua produção depende da ação da enzima dextrana sacarase.

a dextrana é produzida por células ou enzimas isoladas da bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. Dependendo de sua massa molecular, a dextrana apresenta diferentes aplicações:

- dextrana de massa molecular abaixo de 25kDa — indústria de alimentos, como goma espessante e estabilizante;
- dextrana da massa molecular de 25 e 75kDa — uso terapêutico como substituinte de plasma sanguíneo em transfusões;
- dextrana de massa molecular de 75kDa — auxiliar na extração de petróleo em poços exauridos.

Além disso, a dextrana é utilizada na produção de resinas de cromatografia de exclusão (tipo *Sephadex*).

A produção de dextranas, entretanto, pode ser considerada prejudicial e indesejada em alguns casos:

- dextranas produzidas por microrganismos da flora bucal (*Streptococcus mutans*, por exemplo) são responsáveis pela formação da placa bacteriana que pode favorecer à formação de cáries;
- em usinas de açúcar e álcool, a contaminação do caldo por bactérias produtoras de dextrana-sacarase (*Leuconostoc mesenteroides* e algumas espécies do gênero *Lactobacillus*) leva à produção de dextranas que podem interferir com a cristalização da sacarose, causando queda no rendimento e ainda entupimento de filtros.

A hidrólise eficiente de dextranas pode ser alcançada pela aplicação da enzima dextranase. Essa hidrolase, produzida por fungos do gênero *Penicillium*, pode ter atividade de endo- ou exoenzima e é capaz de romper as ligações α -1,6 da dextrana e liberar pequenos oligosacarídeos e glicose, respectivamente.

Observação: alguns microrganismos são ainda capazes de secretar a enzima levana-sacarase, de atividade semelhante à dextrana-sacarase, porém que transfere

▼

A hidrólise eficiente de dextranas pode ser alcançada pela aplicação da enzima dextranase.

unidades de frutose, produzindo levana — polímero de frutoses ligadas entre si por ligações β -2,6. Exemplos de organismos produtores são as bactérias *Aerobacter levanicum* e algumas espécies do gênero *Bacillus* e a levedura *Zymomonas mobilis*.

► Bibliografia

- Barret, F.F. *Enzyme uses in milling and baking industries*. In: Reed, G. *Enzymes in Food Processing*, p. 302-331. Academic Press, Nova York. 1975.
- Bass, E.J.; Cayle, T. *Beer*. In: Reed, G. *Enzymes in Food Processing*, p. 455-472. Academic Press, Nova York. 1975.
- Beldman, G.; Rombouts, F.M.; Voragen, A.G.J.; Pilnik, W. *Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass*. *Enzyme and microbial technology*, 6: 503-507. 1984.
- Bhat, M.K.; Bhat, S. *Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications*. *Biotechnology advances*, 15: 583-620. 1997.
- Brandt, D.A. *Distilled alcoholic beverages*. In: Reed, G. *Enzymes in Food Processing*, p. 443-454. Academic Press, Nova York. 1975.
- Crittenden, R.G.; Playne, M.J. *Production, properties, and application of food-grade oligosaccharides*. *Trends in food science and technology*. 7: 353-361. 1996.
- Fennema, O.R. *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Nova York. 1996.
- Grassin, C.; Fauquembergue, P. *Enzymes in fruit processing*. In: Whitehurst, R.J.; Law, B.A. *Enzymes in Food Technology*, p. 184-199. Sheffield Academic Press (CRC Press), Sheffield. 2002.
- Hamer, R.J. *Enzymes in the baking industry*. In: Tucker, G.A.; Woods, L.F.J. *Enzymes in Food Processing*, p. 191-222. Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall), Londres. 1995.
- Kulp, K. *Carbohydrases*. In: Reed, G. *Enzymes in Food Processing*, p. 54-123. Academic Press, Nova York. 1975.
- Lea, A.G.H. *Enzymes in the production of beverages and fruit juices*. In: Tucker, G.A.; Woods, L.F.J. *Enzymes in Food Processing*, p. 223-249. Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall), Londres. 1995.
- MacAllister, R.V.; Wardrip, E.K.; Schnyder, B.J. *Modified starches, corn syrups containing glucose and maltose, corn syrups containing glucose and fructose, and crystalline dextrose*. In: Reed, G.

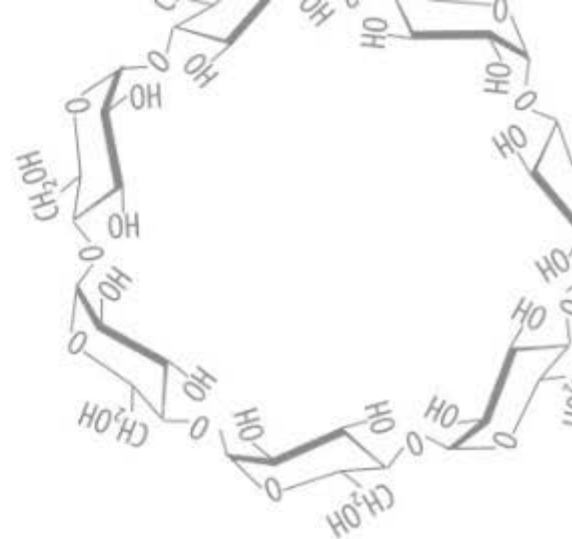
Leitura recomendada: Fennema (1996); Kulp (1975); Woods & Swinton (1995).

- Enzymes in Food Processing, p. 332-361. Academic Press, Nova York. 1975.
- Monsan, P.; Paul, F. *Novel enzymatic synthesis of oligosaccharides and polysaccharides*. In: Fox, P.F. Food Enzymology, Vol. II, p. 69-82. Elsevier, Londres. 1991.
- Moracci, M.; Trincone, A.; Rossi, M. *Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis*. Journal of molecular catalysis B: enzymatic. 11: 155-163. 2001.
- Neubeck, C.E. *Fruits, fruit products, and wines*. In: Reed, G. Enzymes in Food Processing, p. 397-442. Academic Press, Nova York. 1975.
- Olsen, H.S. *Enzymes in starch modification*. In: Whitehurst, R.J.; Law, B.A. Enzymes in Food Technology, p. 200-228. Sheffield Academic Press (CRC Press), Sheffield. 2002.
- Patil, R.S.; Ghormade, V.; Deshpande, M.V. *Chitinolytic Enzymes: an Exploration*. Enzyme and Microbial Technology. 26: 473-483. 2000.
- Pilnik, W.; Voragen, A.G.J. *The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing*. In: Fox, P.F. Food Enzymology, Vol. I, p. 303-336. Elsevier, Londres. 1991.
- Sashiwa *et al.* *Enzymatic Production of N-acetyl-D-Glucosamine from Chitin. Degradation Study of N-Acetylchitooligosaccharide and the Effect of Mixing Crude Enzymes*. Carbohydrate Polymers. 51: 391-395. 2003.
- Schmedding, D.J.M.; van Gestel, M.J.M.C. *Enzymes in Brewing*. In: Whitehurst, R.J.; Law, B.A. Enzymes in Food Technology, p. 57-75. Sheffield Academic Press (CRC Press), Sheffield. 2002.
- Sharroc, K.R. *Cellulase assay methods: a review*. Journal of biochemical and biophysical methods. 17: 81-106. 1998.
- Si, J.Q.; Drost-Lustenberger, C. *Enzymes for bread, pasta, and noodle products*. In: Whitehurst, R.J.; Law, B.A. Enzymes in Food Technology, p. 19-56. Sheffield Academic Press (CRC Press), Sheffield. 2002.
- Slaughter, J.C.; Priest, F.G. *Significance and use of enzymes in brewing*. In: Fox, P.F. Food Enzymology, Vol. II, p. 47-68. Elsevier, Londres. 1991.
- Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N.A. *Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 43(2): 145-171. 2003.
- Szetzli, J. *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. Chemical reviews, 98: 1743-1753. 1998.

- Urlaub, R. *Enzymes in fruit and vegetable juice extraction*. In: Whitehurst, R.J.; Law, B.A. *Enzymes in Food Technology*, p. 144-183. Sheffield Academic Press (CRC Press), Sheffield. 2002.
- van Oort, M; Canal-Llaubères, R-M. *Enzymes in wine production*. In: Whitehurst, R.J.; Law, B.A. *Enzymes in Food Technology*, p. 76-89. Sheffield Academic Press (CRC Press), Sheffield. 2002.
- Whitaker, J.R. *Pectic enzymes*. In: *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, p. 425-436. Marcel Dekker, Nova York. 1994.
- Whitaker, J.R. *The glycoside hidrolases*. In: *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, p. 391-424. Marcel Dekker, Nova York. 1994.
- Woods, L.F.J.; Swinton, S.J. *Enzymes in the starch and sugar industries*. In: Tucker, G.A.; Woods, L.F.J. *Enzymes in Food Processing*, p. 250-267. Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall), Londres. 1995.
- Yun, J.W. *Fructooligosaccharides — occurrence, preparation, and application*. *Enzyme and microbial technology*, 19: 107-117. 1996.

3

Proteases



Luciana Ferracini dos Santos
Maria Gabriela Bello Koblitz

- Introdução, 78
- Características gerais e modo de ação, 79
- Fontes e principais características, 81
- Aplicação industrial, 85
- Métodos de detecção da atividade, 103
- Bibliografia, 103

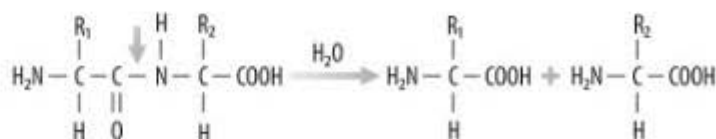
► Introdução

As indústrias de alimentos e de detergentes empregam uma grande variedade das enzimas *proteases*. Na maioria dos casos, as proteases são essenciais para modificação intencional das proteínas dos alimentos. Do ponto de vista nutricional, a hidrólise de proteínas, antes do consumo, favorece sua digestão e absorção pelo organismo. A ação de proteases sobre as proteínas de um alimento pode ter como conseqüências a formação de compostos responsáveis por aroma e textura específicos, a alteração da funcionalidade das proteínas e a formação de peptídios que apresentam atividade biológica, entre outras.

As proteases (EC 3.4) são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases. Elas catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem ainda apresentar atividade sobre ligações éster e amida. São também conhecidas como peptidases ou proteinases. Sua principal função biológica é a hidrólise de proteínas e estão envolvidas nos processos de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e no transporte de proteínas através de membranas. Todas as proteases apresentam um certo grau de especificidade de substrato, em geral relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e àqueles adjacentes a eles. A posição da ligação na cadeia polipeptídica e o tamanho da cadeia podem influenciar a atividade das proteases.

De todas as enzimas produzidas e utilizadas em escala comercial, 75% são hidrolases e, dessas, 60% são proteases (25% proteases alcalinas, 10% quimosina, 3% tripsina e 21% outras proteases). Em 1960, a protease

Proteases catalisam a reação de hidrólise da ligação peptídica de proteínas. Apresentam sempre um certo grau de especificidade em relação aos aminoácidos envolvidos na ligação e a sua posição na molécula. Representam a maior parte das enzimas comerciais, sendo aplicadas, principalmente, nas indústrias de detergentes e de alimentos.



R_1, R_2 : cadeias laterais dos aminoácidos

Figura 3.1 Ação da protease.

Proteases representam 60% de todas as hidrolases comercializadas. A indústria de detergentes é sua maior consumidora, seguida pela indústria de alimentos.

alcalina produzida por *Bacillus licheniformis*, conhecida por subtilisina Carlsberg, foi incorporada a detergentes em pó; desde então, a indústria de detergentes é a maior consumidora de proteases.

A indústria de alimentos é a segunda maior consumidora de proteases e suas aplicações serão discutidas neste capítulo. Além das indústrias mencionadas, as proteases são também usadas na produção de couros, para a remoção de pêlos e para a promoção de flexibilidade e maciez; nesse caso, são frequentemente usadas as enzimas pancreáticas. As proteases são também úteis em pesquisa básica para a elucidação da estrutura de proteínas.

► Características gerais e modo de ação

As proteases são classificadas basicamente de acordo com dois critérios: seu modo de ação e a natureza química do seu sítio catalítico.

De acordo com o modo de ação, as proteases são divididas em dois grandes grupos: exopeptidases, que atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica e endopeptidases (ou proteinases), que agem nas ligações no interior da cadeia protéica.

As exopeptidases dividem-se em:

► Aminopeptidases

Proteases que agem na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica; liberam aminoácidos livres, dipeptídios ou tripeptídios. Geralmente são metalo-proteases.

► Carboxipeptidases

Proteases que agem na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica; liberam aminoácidos livres ou dipeptídios. Podem ser serina-proteases, metalo-proteases ou cisteína-proteases.

As endopeptidases são normalmente classificadas pela natureza química de seu sítio ativo e por seu mecanismo de ação em quatro grupos distintos:

Proteases são classificadas em exopeptidases (amino- e carboxipeptidases) e endopeptidases, de acordo com seu modo de ação, e em serina-proteases, proteases sulfidrílicas, proteases aspárticas e metalo-proteases, de acordo com a natureza de seu sítio ativo.

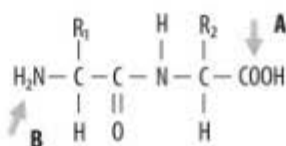


Figura 3.2 Extremidades C-terminal (A) e N-terminal (B).

Serina-proteases são ativas em pH neutro e alcalino. Principais exemplos: tripsina, quimiotripsina e subtilisina.

Proteases sulfidrílicas são ativas em pH neutro, principalmente. As proteases vegetais papaína, bromelina e ficina são os exemplos mais importantes.

Proteases aspárticas atuam em pH ácido. Dentre elas as mais importantes são a pepsina e a renina.

► Serina-proteases (EC 3.4.21)

São caracterizadas pela presença do aminoácido serina no sítio ativo. São inibidas irreversivelmente por 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), diisopropilfluorofosfato (DFP) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), entre outros. São, em geral, ativas em pH de 7,0 a 11,0 e podem apresentar atividade sobre ligações éster e amida. O principal grupo desse tipo de proteases é formado pelas serina-proteases alcalinas, como tripsina, quimotripsina e subtilisina, que apresentam baixa especificidade de substrato. Dentre as serina-proteases, as de maior importância comercial são as subtilisinas, em especial a subtilisina Carlsberg.

► Cisteína-proteases ou proteases sulfidrílicas (EC 3.4.22)

Apresentam em seu sítio ativo cisteína conjugada com histidina. São, normalmente, mais ativas em meios de pH neutro, podendo apresentar atividade em valores de pH ácidos. São ativadas na presença de agentes redutores e inativadas por agentes oxidantes e substâncias que reagem com grupo sulfidril, como *p*-cloromercuriobenzoato (PCMB). As proteases vegetais, como papaína, bromelina e ficina, são as principais cisteína-proteases.

► Proteases aspárticas ou ácidas (EC 3.4.23)

Contêm ácido aspártico em seu sítio ativo. São inibidas por 1,2-epoxi-3-*p*-nitrofenoxipropano (EPNP), na presença de íons de cobre. Em geral, apresentam maior atividade em valores de pH ácido e têm maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos. Entre as principais proteases ácidas estão a pepsina e a renina, assim como diversas proteases microbianas,

sobretudo fúngicas (gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Endothia* e *Rhizomucor*).

► **Metalo-proteases (EC 3.4.24)**

São enzimas que dependem de íons metálicos divalentes para sua atividade. São inibidas por agentes quelantes, como ácido etilendiaminotetracético (EDTA). As metalo-proteases podem ser neutras ou alcalinas. Entre as neutras, encontram-se as collagenases de *Clostridium histolyticum* e elastases de *Pseudomonas aeruginosa*, além da termolisina, uma protease neutra comercial de alta termorresistência, produzida por *Geobacillus stearothermophilus*. Entre as alcalinas, estão as proteases dos gêneros *Serratia* e *Myxobacter*, com atividade em pH de 7,0 a 9,0.

É importante ressaltar que enzimas classificadas no mesmo grupo, como, por exemplo, a enzima subtilisina, que é uma serina-protease secretada por uma bactéria, tem seu mecanismo de ação igual ao de uma serina-protease de mamífero, mas as estruturas primária e terciária dessas enzimas são diferentes.

► **Fontes e principais características**

Por serem indispensáveis à vida, proteases são produzidas por todos os seres vivos: animais, vegetais e microrganismos.

Tabela 3.1 Classes de proteases.

Classe	Exemplo	Aminoácidos do sítio ativo
Serina-protease	Quimotripsina	His ⁵⁷ , Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵
	Subtilisina	Asp ³² , His ⁶⁴ , Ser ²²¹
Cisteína-protease	Papaína	Cys ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asp ¹⁵⁸
Protease aspártica	Pepsina de <i>Penicillium</i> sp.	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metalo-protease	Carboxipeptidase A bovina	Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁸
Nota: Asp: ácido aspártico, Ser: serina, His: histidina, Cys: cisteína, Glu: glutamina, Try: triptofano, Zn: zinco.		

Metalo-proteases podem ser neutras ou alcalinas. A principal representante desta classe é a termolisina.

Proteases vegetais são muito usadas na indústria de alimentos por serem consideradas seguras para consumo. São mais abundantes nos frutos verdes do que nos maduros.

► Proteases vegetais

As proteases vegetais estão entre as mais empregadas na indústria de alimentos por serem consideradas seguras para o consumo humano e por serem tradicionalmente empregadas no preparo de diversos alimentos. Em geral, a atividade dessas proteases é maior nos vegetais verdes, em comparação com as mesmas espécies em estado mais avançado de maturação. A papaína, a bromelina e a ficina estão entre as mais importantes cisteína-proteases.

Papaína (EC. 3.4.22.2). É uma cisteína-protease extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*). Geralmente é comercializada na forma de extrato bruto que contém diferentes proteases, entre as quais as mais importantes são a papaína e a quimopapaína (QP-A e QP-B), com características bastante semelhantes e que variam ligeiramente com a variedade plantada, o clima e o manejo, além do processo de extração/concentração utilizado. Normalmente, a papaína apresenta atividade proteolítica em valores de pH de 5,0 a 9,0. Para os substratos caseína e albumina, seu pH ótimo de atuação é 7,0. Sua atividade ótima é observada em temperaturas de 60 a 70°C; esta enzima permanece estável em temperaturas até 90°C. A papaína apresenta ainda atividade sobre ligações éster e amida e tem boa atuação na síntese de peptídios. Apresenta baixa especificidade de substrato e hidrolisa preferencialmente, segundo Rao *et al.* (1998), ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina.

Bromelina (EC 3.4.22.4). É uma cisteína-protease extraída do pedúnculo ou do fruto do abacaxizeiro (*Ananas comosus*). Tem atividade ótima em pH de 6,0 a 8,0 e é menos termooestável que a papaína, perdendo rapidamente sua atividade em temperaturas superiores a 70°C.

Ficina (EC 3.4.22.3). É uma cisteína-protease menos disponível comercialmente que a papaína e a bromelina; é extraída do látex de diversas espécies do gênero *Ficus*. Apresenta maior atividade em valores de pH de 6,0 a 8,0 e em temperatura de 60°C. Assim como as outras pro-

Papaína, bromelina e ficina são proteases obtidas de frutos do mamoeiro, do abacaxizeiro e de espécies do gênero *Ficus*, respectivamente, que apresentam baixa especificidade. A papaína tem alta estabilidade térmica e é a de maior disponibilidade no mercado.

teases vegetais, a ficina apresenta baixa especificidade de substrato e hidrolisa ligações que envolvem diversos aminoácidos.

► Proteases animais

As proteases animais estão entre as enzimas mais estudadas por seu interesse para a área de saúde. As mais importantes, comercialmente, são as proteases gástricas (renina e pepsina) e as pancreáticas (tripsina e quimotripsina).

Renina (EC 3.4.23.15) ou *quimosina*. É uma das proteases que apresenta maior valor para a indústria de alimentos. É uma protease aspártica extraída do quarto estômago (abomaso) de bezerros não desmamados. A renina é extraída do estômago fresco ou seco, com o auxílio de solução de cloreto de sódio e de outros compostos. Após a extração, a solução enzimática obtida pode ser adicionada de conservantes, precipitada e seca ou liofilizada. O método de extração utilizado é tradicional e característico de cada região produtora.

Como outras enzimas gástricas, a renina é sintetizada na forma de pró-renina inativa. A pró-renina é convertida em renina por hidrólise parcial que libera um peptídeo de sua cadeia protéica. Essa hidrólise é espontânea em pH ácido (abaixo de 2,0) e acontece por autólise em pH em torno de 5,0, podendo ser catalisada também pela pepsina. A renina é inativada em pH neutro ou alcalino e perde gradualmente sua atividade em pH de 3,5 a 4,5 por autodigestão.

Pepsina (EC 3.4.23.1). Protease aspártica produzida pela mucosa do estômago na forma inativa de pepsinogênio. Em pH abaixo de 5,0, torna-se ativa por autólise. Em pH acima de 5,0, as partes do peptídeo que foram removidas para sua ativação funcionam como inibidores alostéricos reversíveis da pepsina, sendo removidos quando o pH cair novamente. Apresenta maior atividade na faixa de pH de 1,0 a 4,0, mas seu pH ótimo é 1,8. Inativa-se completamente em pH superior a 6,0. Sua atividade é

As proteases animais mais importantes são as gástricas (renina e pepsina) e as pancreáticas (tripsina e quimotripsina).

Renina é a protease animal de maior aplicação comercial. Apresenta alta especificidade e é obtida do quarto estômago de bezerros. Pepsina é a protease digestiva do estômago, cujo pH ótimo é de 1,8.

Tripsina e quimotripsina são produzidas no pâncreas e agem no intestino. Sua atividade é controlada por inibidores de tripsina encontrados em diversos alimentos.

bastante influenciada pelo substrato. Apresenta baixa especificidade; no entanto, prefere ligações peptídicas que envolvam aminoácidos hidrofóbicos.

Tripsina (EC 3.4.21.4). Serina-protease secretada pelo pâncreas, é uma das enzimas digestivas mais importantes. É sintetizada na forma inativa de tripsinogênio no pâncreas de animais superiores e é ativada por hidrólise no duodeno. Essa hidrólise é catalisada por outras enteropeptidases ou pela própria tripsina. Sua regulação é feita pela síntese de inibidores de tripsina, também sintetizados pelo pâncreas e que controlam a ação dessa enzima quando ela está presente em pequenas quantidades. São endopeptidases altamente específicas que só hidrolisam ligações que envolvem o grupo carboxílico da lisina e da arginina. São estáveis em pH abaixo de 6,0 e sofrem autólise a partir desse valor. Sua atividade ótima ocorre em pH de 7,0 a 9,0, característico do intestino.

Inibidores de tripsina são peptídios produzidos pelo pâncreas, mas estão também presentes na soja, no trigo e em outros alimentos; impedem a digestão de proteínas ingeridas com eles. Esses inibidores contidos em alimentos à base de soja e em rações devem ser considerados, pois eles reduzem expressivamente o valor nutricional do alimento.

Quimotripsina (EC 3.4.21.1). É uma serina-protease bastante semelhante à tripsina e também é sintetizada como zimogênio pelo pâncreas. Apresenta duas frações de propriedades semelhantes. Hidrolisa preferencialmente ligações que envolvem aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), mas pode também hidrolisar ligações entre todos os aminoácidos hidrofóbicos. É estável em pH ácido e neutro e apresenta pH ótimo de atividade de 7,0 a 9,0.

Catepsinas e calpaínas são proteases intracelulares importantes para a transformação do músculo em carne após o abate.

Catepsinas e calpaínas. São cisteína-proteases intracelulares relacionadas à resolução do *rigor mortis*. Serão discutidas em maiores detalhes no capítulo sobre a bioquímica da carne.

▼

Microrganismos são excelentes fontes de enzimas em virtude de sua diversidade e possibilidade de produção em larga escala. Atualmente, cerca de 40% das enzimas comerciais é de origem microbiana.

► Proteases microbianas

Os microrganismos são excelentes fontes de enzimas em razão da grande diversidade e relativa facilidade de produção em larga escala. No passado, todas as enzimas comerciais eram de origem animal ou vegetal. Na atualidade, estão sendo introduzidas no mercado as enzimas microbianas, que já representam 40% do total utilizado, em virtude de sua alta eficiência.

Origem bacteriana. A maior parte das proteases comerciais é produzida por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Geobacillus*. As proteases bacterianas neutras são ativas em valores de pH de 5,0 a 8,0 e apresentam baixa estabilidade térmica. Embora tenham preferência por ligações entre aminoácidos hidrofóbicos, o grau de hidrólise pode ser controlado por alterações no pH e na temperatura da reação proteolítica. As proteases bacterianas alcalinas apresentam maior atividade em pH de 8,0 a 11,0 e a temperaturas de 50 a 60°C. Em geral, têm baixa especificidade de substrato e são mais utilizadas na indústria de detergentes.

▼

Proteases bacterianas comerciais são, geralmente, neutras ou alcalinas, sendo estas últimas as principais enzimas utilizadas em detergentes. Uma única espécie de fungo filamentoso pode produzir proteases ácidas neutras e alcalinas (isoenzimas).

Origem fúngica. Uma única espécie de fungo pode produzir diferentes proteases (alcalinas, neutras e ácidas). É o caso do *Aspergillus oryzae* que produz três proteases extracelulares, de modo que o extrato obtido por fermentação apresenta atividade proteolítica em valores de pH de 4,0 a 11,0. Sua temperatura ótima de atividade é observada em torno dos 40°C e essas proteases são inativadas em temperaturas acima de 50°C. Em geral, as proteases fúngicas são ativas em pH de 4,0 a 4,5 e as neutras em pH 7,0; e essas são, geralmente, metalo-proteases.

► Aplicação industrial

► Clarificação de cerveja

Após a fermentação alcoólica, a cerveja passa por um período de maturação a baixa temperatura (cerca de 0°C). A duração da maturação depende do tipo de cerveja, varia de poucos dias a várias semanas e sua principal

Após a fermentação a cerveja passa por um período de maturação a frio para destruição de diacetil. Nesse período e depois, no resfriamento pré-consumo, pode ocorrer turvação por insolubilização de peptídeos de alta massa molecular.

Chillproofing é o processo de estabilização de cervejas para evitar a turvação pelo frio. Consiste na hidrólise dos peptídeos, provenientes do malte e de cereais não-maltados, por proteases de baixa especificidade. O resultado da hidrólise, de baixa massa molecular, permanece solúvel mesmo em baixas temperaturas.

finalidade é a destruição de diacetil, uma substância de sabor desagradável que se acumula no produto durante a fermentação. Ao longo da maturação, o diacetil é transformado em acetoína, que não apresenta sabor. Esse processo pode ser acelerado pela adição de enzimas, como acetolactato-descarboxilases e diacetil-redutases.

Outro fenômeno que ocorre durante a maturação é a turvação da cerveja. Ela acontece pela interação de compostos fenólicos e polipeptídios, provenientes do malte e de cereais não-maltados, que se insolubilizam em temperatura baixa. A simples filtração desse precipitado não garante que não ocorra nova precipitação posteriormente, portanto é necessário um tratamento adicional com proteases. As proteases hidrolisam os peptídios e impedem que eles se insolubilizem, evitando a turvação. Em geral, no processo de clarificação são usadas papaínas, que são proteases com baixa especificidade e que hidrolisam peptídios de diferentes fontes. A papaína tem bom preço no mercado e seu uso é permitido em alimentos. Além disso, a papaína apresenta alta termoestabilidade, permanecendo ativa após a operação de pasteurização e também ao longo da vida de prateleira do produto. A operação de *chillproofing* é utilizada por todas as cervejarias que comercializam cerveja clarificada. Em alguns casos, recentemente, o uso de papaína vem sendo substituído pela aplicação de proteases microbianas.

É importante notar que a presença de proteínas é vital para a formação da espuma em cervejas e, em geral, essas moléculas devem apresentar alta massa molecular. Segundo Slaughter e Priest (1991), a adição de papaína à cerveja não afeta a formação de espuma, pois as substâncias envolvidas nesse processo são moléculas complexas, formadas por resíduos de polipeptídios, polifenóis e carboidratos, além de fosfato, não constituindo substrato para a papaína.

► Amaciamento da carne (tenderização enzimática)

A maciez é a característica mais desejada em carnes. É definida como o “atributo da carne cozida de ter fácil

▼

Maciez é a característica mais desejada em carnes e diferencia a carne "de primeira" da carne "de segunda". Pode ser alcançada por longos períodos de maturação, que elevam o custo da carne.

mastigabilidade sem perder sua textura característica". O método convencional de se atingir a maciez é pela maturação prolongada. O tempo normal de comercialização de carcaças bovinas é de 3 a 5 dias após o abate. Para uma tenderização satisfatória são necessários de 10 dias a 4 semanas de maturação, dependendo da peça, da qualidade da carcaça, da idade do animal abatido, entre outros fatores. O custo eleva-se em decorrência do longo tempo de armazenamento a frio, da redução do peso por ressecamento da carcaça e da possibilidade de desenvolvimento de características organolépticas indesejadas.

Uma possibilidade de acelerar esse processo é a aplicação de proteases que irão hidrolisar as proteínas da carne, tornando-a mais macia. Dentre as enzimas proteolíticas, as de origem vegetal são as mais utilizadas para esse fim. Dentre essas proteases, a mais aplicada é a papaína. Apesar de apresentar menor atividade sobre o colágeno que a bromelina e a ficina, a papaína é bastante eficiente por sua alta afinidade pela actina e boa atividade sobre o colágeno desnaturado pelo calor. A papaína apresenta ainda as seguintes vantagens: fornecimento regular no mercado a preços acessíveis, temperatura de atividade de 60 a 70°C, o que evita haver hidrólise durante o armazenamento da carne a frio, e alta estabilidade térmica, o que garante o amaciamento durante o cozimento, pois a enzima mantém-se ativa por longo período a altas temperaturas.

A dosagem de enzima deve ser avaliada de acordo com a finalidade do corte. Peças que serão assadas passam mais tempo na temperatura de atividade da enzima durante o cozimento e devem, portanto, receber menores quantidades da enzima. Os cortes destinados à fritura, que atingem temperaturas muito altas em menores intervalos de tempo, devem receber maiores quantidades de enzima para um amaciamento satisfatório.

Nas carnes destinadas a restaurantes e serviços de alimentação, que sofrem longo tempo de aquecimento,

▼

Tenderização enzimática é o processo de amaciamento da carne pela ação de proteases de baixa especificidade. A hidrólise das proteínas dos tecidos conjuntivo e miofibrilar garante a alteração necessária na textura.

A dosagem da enzima depende da finalidade do corte: peças assadas devem receber menos enzimas que peças a serem fritas.

é usada uma mistura de papaína e bromelina. A bromelina é bem menos termorresistente e é inativada após certo período de aquecimento, o que evita a hidrólise excessiva.

A maior dificuldade apresentada pela tenderização enzimática é a distribuição uniforme da enzima na peça de carne. Algumas metodologias foram desenvolvidas para esse fim: o método clássico, a imersão, a injeção e a injeção no animal vivo.

Método clássico. Aplicação superficial da enzima em veículo de sal. É um método prático e de baixo custo, mas apresenta problemas de difusão da enzima no corte e necessita do uso de sal.

Imersão. Os cortes da carne são submersos na solução de enzima. É um método bastante prático e que possibilita automação. Apresenta problemas de difusão, contaminação cruzada e a possibilidade de diluição da solução enzimática pelos sucos da carne.

Injeção. Uso de seringas ou pistolas para aplicação de solução enzimática na peça de carne. Pode ser usada em peças maiores, destinadas ao preparo de assados. A injeção malfeita pode ocasionar a formação de bolsas mais macias dentro da peça.

Injeção no animal vivo. Essa técnica, também chamada pré-tenderização, consiste na injeção feita na jugular do animal, 10 a 30 minutos antes do abate. Proporciona distribuição uniforme da enzima em todos os tecidos através da corrente sanguínea. Depende de pessoal especializado e do uso de enzima purificada para evitar resposta imunológica no animal vivo. Em princípio, a enzima não apresenta atividade na temperatura do corpo do animal e só seria ativada quando o corte da carne fosse aquecido durante o cozimento. No entanto, para garantir que não haja possibilidade de hidrólise dos tecidos do animal vivo, a enzima é inativada antes da injeção por meio de tratamento prévio com peróxido de hidrogênio. Esse reagente oxida o sítio ativo da enzima e impossibilita

A maior dificuldade da tenderização enzimática reside na difusão da enzima pela peça de carne. A metodologia de aplicação da enzima deve visar sua distribuição uniforme.

O futuro da tenderização enzimática reside, muito provavelmente, na aplicação de collagenases e elastases recombinantes. A ação conjunta dessas enzimas sobre o tecido conectivo dos cortes de dianteiro bovino poderia transformar a carne "de segunda" em carne "de primeira".

A caseína, uma mistura de fosfoproteínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ caseínas), está organizada em micelas que se mantêm em suspensão coloidal.

qualquer atividade catalítica no animal vivo. O excesso de peróxido de hidrogênio deve ser removido antes da injeção pela ação de catalases. Quando o animal é abatido, a tensão de oxigênio nos tecidos cai muito, favorecendo a redução do sítio ativo da papaína que volta a ser ativa. Entretanto, atividade de hidrólise significativa só ocorre quando a peça de carne é aquecida acima de 60°C. Esse processo é utilizado na Inglaterra e nos EUA, em uma pequena parte do rebanho, para produção de carne de qualidade certificada.

A distribuição uniforme por todo o corpo do animal tem também efeitos indesejados: pode provocar a perda de órgãos de interesse comercial, como fígado e rins, pela tenderização desses tecidos. Para minimizar o problema, alguns autores sugerem o uso de collagenases microbianas nesse tipo de amaciamento. Essas enzimas apresentam atividade quase exclusiva sobre o colágeno, favorecendo o amaciamento de peças cuja dureza é causada por excesso de tecido conjuntivo intramuscular, porém não são capazes de acelerar a tenderização do tecido miofibrilar. No entanto, collagenases não estão disponíveis comercialmente para uso em alimentos por serem secretadas, em sua maioria, por gêneros de bactérias potencialmente patogênicas.

► Coagulação do leite

A produção de queijos baseia-se, inicialmente, na separação de caseínas e gordura do leite da fração que constitui o soro. O soro é formado, em sua maior parte, por água, lactose, sais e outras proteínas não-caseínas. Para maior compreensão dos métodos de separação da caseína, será inicialmente discutido o modelo de estrutura micelar proposto para a caseína do leite.

Segundo o modelo de estrutura proposto, a caseína do leite está organizada em micelas que se mantêm em suspensão coloidal. A caseína é uma mistura de fosfoproteínas muito semelhantes: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas. As micelas são compostas, em sua parte interior, por

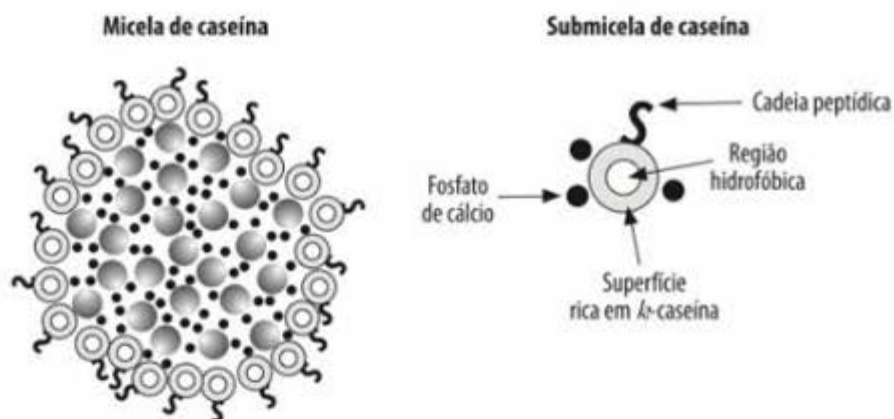


Figura 3.3 Modelo proposto para estrutura micelar da caseína do leite.

As micelas contêm, em sua fração interna, as caseínas fosfatadas que precipitam na presença de cálcio e, em sua parte externa, a κ -caseína que é estável ao cálcio e protetora do estado coloidal das outras frações.

frações de caseína altamente fosfatadas, que precipitam na presença de íons cálcio e, em sua parte externa, pela κ -caseína, que é pouco fosfatada e é estável na presença de íons cálcio. A κ -caseína mantém a estabilidade das micelas, pois é a protetora do estado coloidal das outras frações (α_{s1} , α_{s2} e β) da caseína.

A cadeia peptídica representada na Figura 3.3 corresponde à cadeia C-terminal da κ -caseína que se dirige para fora da micela, formando uma camada de “cabelos” que previne a agregação com outras micelas. É importante salientar que a estrutura micelar ainda é objeto de estudo e discussão. Foram publicados trabalhos que propõem que as micelas não são estruturas tão fixas. Observou-se



Figura 3.4 Modelo da micela de caseína com equilíbrio dinâmico.

que mudanças no pH, temperatura e força iônica promovem alterações na sua distribuição e na proporção de submicelas livres. Essas observações suscitaram nova proposta, recentemente, de um modelo mais dinâmico que permite a agregação e a desagregação balanceada de submicelas.

A precipitação das caseínas do leite pode ser obtida de duas maneiras: por *precipitação isoelétrica* e por *proteólise limitada*.

Precipitação isoelétrica. Acontece por redução do pH do leite para valores em torno de 4,6 por adição de ácido láctico (acidificação direta) ou pelo uso de culturas lácticas, chamadas culturas *starter*, que fermentam lactose, produzindo ácido láctico (acidificação *in situ*). Ao atingir o pH de 4,6, correspondente ao ponto isoelétrico da caseína bruta do leite, ocorre a insolubilização dessas proteínas, que precipitam.

Proteólise limitada. Quando a *k*-caseína sofre hidrólise, os íons cálcio do leite ligam-se às frações fosfatadas da caseína, formando ligações cruzadas e provocando sua precipitação em forma de coágulos. Entretanto, se a hidrólise não for limitada, haverá destruição do coágulo e solubilização de pequenos peptídios, o que irá afetar seriamente a textura do queijo e seu rendimento. Além disso, a hidrólise excessiva pode ocasionar a liberação de peptídios que contêm aminoácidos hidrofóbicos na extremidade C-terminal. Esses peptídios apresentam sabor amargo e interferem na qualidade do produto final.

O desempenho de uma protease na coagulação do leite para a produção de queijo pode ser avaliado pela relação entre sua capacidade para formar coágulo e a hidrólise total das caseínas do leite. Historicamente, a enzima mais utilizada nesse processo é a renina ou quimosina. A renina apresenta altíssima especificidade pela ligação peptídica entre os aminoácidos fenilalanina (105) e metionina (106) da *k*-caseína, cuja hidrólise é suficiente para desestabilizar a micela de caseína, liberando a *para-k*-caseína e um glicopeptídio C-terminal. Além disso,

▼

A precipitação das caseínas do leite pode ser obtida por precipitação isoelétrica que ocorre quando o pH do leite atinge o ponto isoelétrico das caseínas (4,6) ou por proteólise limitada, pela ação de proteases específicas.

▼

O desempenho de uma protease na coagulação do leite para produção de queijo pode ser avaliado pela relação entre sua capacidade de coagulação e a hidrólise total das caseínas do leite.

Produção de queijos – a formação de coágulos de caseína depende da ação de enzimas proteolíticas sobre a κ -caseína, que desestabiliza as micelas e permite a reação do cálcio com as caseínas fosfatadas. A proteólise deve ser limitada para evitar defeitos na textura, baixo rendimento e formação de peptídeos de sabor amargo. A enzima mais indicada para essa aplicação é a renina ou quimosina, ingrediente ativo dos coalhos convencionais.

essa enzima só é capaz de hidrolisar uma quantidade extremamente limitada de outras ligações nas frações de caseína e essas reações acontecem de forma bastante lenta. A renina atua em uma faixa de pH limitada, fora da qual sofre autólise rapidamente. Em consequência, essa enzima tem uma ótima capacidade de coagulação do leite: promove hidrólise limitada e proporciona coágulos de textura excelente, sem geração de amargor e com alto rendimento.

Uma vez que o custo da renina é relativamente alto e sua oferta no mercado insuficiente para suprir a demanda, substitutos de renina podem ser aplicados industrialmente. Uma possibilidade é o uso de pepsina suína, comercializada em misturas com renina, nas proporções de 50:50 e 20:80; alcança bastante sucesso na coagulação do leite. Por ser rapidamente inativada em valores de pH em torno de 6,5 (pH do leite), essa protease perde sua atividade durante a coagulação, não promovendo proteólise excessiva. Entretanto, por ter afinidade por ligações que envolvem aminoácidos hidrofóbicos, a pepsina pode provocar o surgimento de sabor amargo indesejado.

Proteases ácidas de *Rhizomucor miebei*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus oryzae* e *Endothia parasitica* apresentam especificidade suficientemente semelhante à da renina para serem capazes de produzir coágulos de boa qualidade, sendo conhecidas como “reninas microbianas”. No entanto, essas proteases são bem resistentes a diferentes condições de temperatura e pH, sofrem pouca ou nenhuma autólise e provocam proteólise excessiva, o que diminui o rendimento do processo e causa sabor amargo durante o período de maturação. Para minimizar os efeitos, as enzimas podem ser submetidas a tratamento com peróxido de hidrogênio, que converte seus resíduos de metionina em sulfóxidos, reduzindo sua estabilidade térmica à temperatura de 10°C. Evitam-se os efeitos negativos, mas aumenta-se o custo de obtenção, tornando-as menos competitivas em relação à renina bovina.

As reninas microbianas já são usadas na produção de queijos, desde 1970. Coalhos de origem microbiana

Alguns substitutos de renina podem ser aplicados comercialmente: pepsina suína, “reninas microbianas” e renina de organismos geneticamente modificados.

▼

Pepsina suína é comercializada em misturas com renina nas proporções 50:50 e 20:80. Nos "coalhos microbianos" são aplicadas proteases ácidas de *Rhizomucor*, *Aspergillus* e *Endothia*. A renina bovina já foi expressa em fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Não há aplicação industrial para a renina imobilizada.

têm sido aplicados em larga escala nos EUA. Cerca de 70% dos queijos produzidos nos EUA e cerca de 30% da produção mundial utilizam proteases microbianas. A presença de proteases durante a maturação de alguns queijos não é totalmente indesejada, pois elas participam da promoção do *flavor* e da textura, característicos de certos tipos de queijo.

Outra forma estudada para se obter a renina bovina foi a clonagem do gene responsável por sua codificação em diferentes leveduras, bactérias e fungos, como: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger*, que produziram a enzima com sucesso. Esse tipo de quimosina vem sendo testado desde 1988 e já se encontra disponível no mercado. Apesar do custo de produção relativamente alto, representa cerca de 50% do coalho usado na produção de queijos do tipo cheddar nos EUA. Futuramente, é provável que a renina produzida por microrganismos geneticamente modificados seja a principal enzima utilizada na produção de queijos no mundo.

Após o processo de coagulação, a maior parte da renina utilizada se perde para o soro. Para minimizar a perda, o uso da enzima imobilizada permitiria sua recuperação e reutilização. Entretanto, todas as tentativas de imobilização da renina geraram produtos de baixa atividade ou apresentaram dificuldade de difusão, o que impediu sua produção em escala comercial.

► Maturação acelerada de queijos

A maturação de queijos é, tradicionalmente, uma forma de preservar o valor nutricional do leite, por maiores períodos de tempo, em um produto palatável. É importante ressaltar que nem todos os componentes do leite são concentrados no queijo. Os componentes hidrossolúveis, como lactose, sais e vitaminas, ficam dissolvidos no soro, e as proteínas albuminas e globulinas não coagulam juntamente com a caseína, ficando também no soro.

Durante sua produção, diversos tipos de queijos passam por longos períodos de maturação até atingir as

▼

A maturação de queijos é, tradicionalmente, uma forma de preservar o valor nutricional do leite, por maiores períodos de tempo, em um produto palatável.

características desejadas. Atualmente, esse longo período implica alto custo com o armazenamento e demora no retorno do investimento, que só ocorre quando o produto chega ao mercado. Em virtude disso, grandes empresas produtoras de queijo vêm investindo em metodologias inovadoras para acelerar a maturação.

O processo de maturação exige condições de temperatura e umidade controladas e consiste na decomposição de gorduras, proteínas e carboidratos da massa do queijo provocada pela cultura *starter* (bactérias lácticas), do coalho e de eventuais microbiotas secundárias. A renina libera peptídios de alto peso molecular, mas não aminoácidos livres. As importantes modificações de textura e aroma no queijo são devidas, principalmente, às proteases que geram peptídios, aminoácidos, aminas, compostos sulfurados e tiol-ésteres, e às lipases que geram cetonas, lactonas e ácidos graxos.

A proteólise é um dos mais importantes processos de maturação de queijos, pois peptídios e aminoácidos livres, gerados pela ação de proteases, são precursores de sabor, além de serem fontes de nitrogênio para a microbiota secundária.

A maturação de queijos consiste em alterações de aroma, sabor e textura causadas pela ação de diversas enzimas. Proteases agem sobre a textura e na liberação de aminoácidos que serão transformados em compostos de flavor: aldeídos, aminas, ácidos.

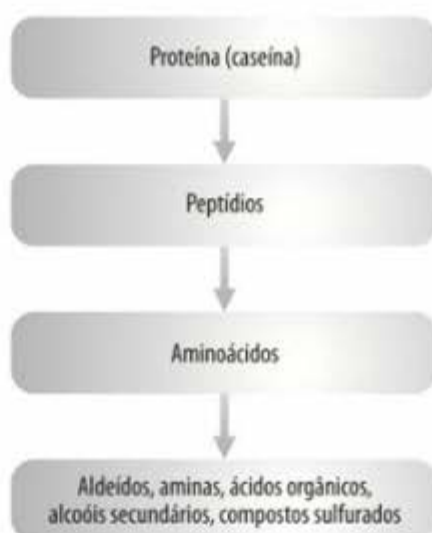


Figura 3.5 Mecanismo de origem dos compostos aromáticos a partir da ação de protease.

Os aromas de origem proteolítica resultam de reações bioquímicas posteriores dos aminoácidos livres, tais como desaminação, transaminação e descarboxilação, que geram aldeídos, aminas, alcoóis e ácidos: compostos característicos de aroma.

Na maturação acelerada são incorporadas proteases neutras e exopeptidases à massa inicial. As primeiras provocam as alterações desejadas na textura e as últimas liberam aminoácidos precursores de aroma e sabor.

As principais empresas a investir nesse tipo de tecnologia são as grandes produtoras americanas de queijo tipo cheddar, cujo volume de produção torna o custo da maturação tradicional um grave problema. As primeiras tentativas de se incorporar proteases a queijos tipo cheddar produziram sabor amargo e provocaram colapso da estrutura do queijo, gerando um produto inaceitável. Sabe-se, hoje, que é necessária a incorporação de uma pequena quantidade de proteases neutras, geralmente de origem bacteriana (*Bacillus amyloliquefaciens*), que irão hidrolisar as proteínas da massa de forma limitada, produzindo uma textura desejável e gerando peptídios livres. As proteases neutras têm vida ativa muito curta nas condições existentes na massa inicial, sendo rapidamente inativadas, o que evita a proteólise excessiva. Em conjunto com essas proteases devem ser incorporadas exopeptidases, que apresentam baixa afinidade por peptídios de alta massa molecular e interferem muito pouco na textura do queijo. Sua principal finalidade é atacar os peptídios menores, liberados pela ação de proteases neutras, produzindo aminoácidos livres responsáveis pela formação dos compostos de aroma e sabor.

A maior dificuldade no processo de maturação acelerada está na difusão das enzimas na massa. A melhor forma de aplicação é o uso de enzimas microencapsuladas.

A maior dificuldade do uso de proteases na aceleração da maturação de queijo cheddar é a distribuição/difusão das enzimas na massa. Idealmente, essas enzimas deveriam ser incorporadas ao leite, antes da coagulação. No entanto, sua presença interfere na qualidade e no rendimento do coágulo, além de haver grande perda de enzimas para o soro. Em estudos recentes, vem sendo avaliada a microencapsulação das enzimas em lipossomas, que possam ser rompidos por controle externo: mudança na temperatura, por exemplo. As microcápsulas poderiam ser adicionadas ao leite ou à coalhada, mini-

A maior aplicação comercial está na produção de "massas de queijo" utilizadas para aromatizar molhos, sopas, *snacks*, etc.

mizando perdas de enzimas, pois os lipossomas, quando adicionados ao leite, precipitam quase totalmente junto com a caseína.

A maturação acelerada tem grande aplicação na produção de massa (*slurry*) de queijo que é utilizada como ingrediente na fabricação de biscoitos, molhos, sopas, *snacks*, entre outros. Para esse tipo de produto, a textura não apresenta importância, mas o desenvolvimento do aroma é sua característica mais importante. Esses aromas são produzidos pela ação de proteases, lipases, transaminases, entre outras enzimas. Já existem no mercado massas de queijo com sabor de diversos tipos de queijo (gorgonzola, cheddar, parmesão), obtidos por processamento enzimático.

► Panificação

As farinhas de trigo para uso industrial são classificadas de acordo com seu conteúdo de proteína, que pode variar de 5 a 20%. Essa variação deve-se a fatores genéticos, ambientais e de manejo. A fração protéica do trigo, chamada glúten, é formada por dois constituintes básicos: glutelina, uma proteína fibrilar, capaz de se dispor na forma de rede, e gliadina, proteína globular que interage com a glutelina. Essas proteínas dão à farinha a propriedade de formar uma massa viscoelástica com capacidade de reter o ar. A força do glúten é uma função da concentração dessas proteínas e da sua composição.

A fração protéica do trigo, chamada de glúten, dá à farinha a propriedade de formar uma massa viscoelástica capaz de reter o ar.

A rede do glúten é formada por ligações do tipo pontes de dissulfeto e quanto maior o número dessas ligações, mais difícil será trabalhar a massa. A quantidade de proteína na farinha e a proporção de seus constituintes determinam as características de extensibilidade e de elasticidade da massa e do produto final. Uma massa de pão que contém pouco glúten será pegajosa e grudenta e produzirá um pão duro, de pouco crescimento. Entretanto, uma massa de bolo com muito glúten gerará um produto pouco macio, incapaz de se expandir pela ação do gás produzido pelo fermento químico.

Uma massa de pão com glúten fraco produzirá um pão duro e que cresce pouco (não retém o ar). Uma massa de bolo com glúten forte será incapaz de ser expandir pela ação do fermento químico.

É possível modificar as propriedades do glúten e reduzir sua força pela adição de produtos químicos, como metabissulfito de sódio, que tornam a farinha mais adequada à finalidade desejada (produção de bolos, biscoitos, por exemplo). A utilização desse produto químico é regulamentada por legislação específica e proibida em alguns países. Uma alternativa é a utilização de proteases com a mesma finalidade.

As proteases modificam a rede protéica pela quebra das ligações peptídicas. A extensão da quebra depende do tipo de protease utilizada, da sua concentração e do tempo de reação. A utilização de protease nos processos de panificação fornece produtos mais macios, de menor densidade e de aparência agradável, além de eliminar o sabor (*after taste*), provocado pelo metabissulfito.

O processo de produção do pão envolve uma etapa de trabalho mecânico cuja finalidade é o rompimento das cadeias polipeptídicas do glúten para que a rede formada por essas proteínas não impeça o crescimento da massa. O uso de proteases que hidrolisam os constituintes do glúten reduz o tempo de trabalho mecânico em até 30%, sem prejuízo da elasticidade da massa e com possível melhoria do aroma do produto final. Nesses casos, é indispensável uma análise prévia do conteúdo de glúten da farinha para evitar riscos de hidrólise excessiva ou trabalho mecânico desnecessário da massa, que podem provocar efeitos indesejáveis ao produto final.

Proteases podem ser aplicadas no controle da força do glúten, garantindo menor tempo de trabalho da massa na produção de pães (enzimas fúngicas) e redução do teor de glúten para produção de bolos e biscoitos (enzimas vegetais e/ou bacterianas).

As proteases de *Aspergillus oryzae* e *A. niger* são utilizadas para esse fim por serem consideradas seguras para o consumo e por apresentarem baixa especificidade, além de serem menos ativas que as proteases vegetais, o que garante a integridade do glúten. A aplicação das proteases é feita durante a fase de fermentação para que haja tempo para sua ação, uma vez que serão inativadas na temperatura do forno. Esse processo é aplicado em escala industrial no mundo todo; nos EUA é utilizado desde a década de 1970.

A hidrólise do glúten de farinhas com alto teor de proteína dá origem a produtos com maior valor nutricional em comparação com o uso de farinhas de baixo conteúdo protéico.

A hidrólise enzimática permite a liberação de grupos -NH_2 e -COOH pelo rompimento da ligação peptídica entre eles. Esses grupos podem reagir com o açúcar usado na formulação ou o produzido por α -amilases, sendo responsáveis pelo desenvolvimento do sabor e da cor característica do pão (reação de Maillard).

Em biscoitos do tipo *cracker*, o uso de proteases de *Aspergillus oryzae* permite a abertura homogênea da massa e evita a deformação do produto no forno. Na produção de bolos e *wafers*, que exigem farinhas com baixo conteúdo de proteína, o uso de proteases vegetais pode substituir a aplicação de metabissulfito de sódio. Nesses casos é indicado o uso de papaína ou bromelina, sendo esta última mais efetiva que a primeira. O uso de protease neutra de *Bacillus subtilis* também é indicado.

Além disso, a utilização de proteases em farinhas com alto teor de proteína dará origem a produtos com maior valor nutricional do que aqueles originados de farinhas com baixo teor de proteína.

► Modificação de proteínas

As proteínas podem ser modificadas por hidrólise, síntese e reestruturação.

Hidrólise

Os hidrolisados protéicos são utilizados como ingredientes em vários alimentos, com o objetivo de conferir sabor característico, alterar a textura, emulsificar, produzir espuma ou aumentar o valor nutricional. Comercialmente, eles podem ser obtidos por hidrólise química ou enzimática de diferentes fontes protéicas. As características do produto são determinadas pelas condições de hidrólise, pela especificidade da enzima utilizada e pela fonte de proteína.

Hidrolisados de carne bovina e peixe são usados como flavorizantes na produção de temperos, caldos, sopas e molhos.

Hidrolisados protéicos são obtidos pela ação de proteases específicas sobre diversas fontes protéicas com a finalidade de gerar compostos com diferentes funcionalidades: aromatizantes, espumantes, emulsificantes.

Vários alimentos orientais devem seu sabor característico à hidrólise de proteínas insolúveis da soja em peptídeos solúveis.

Vários alimentos orientais, como missô e shoyu, devem seu sabor característico à hidrólise de proteínas insolúveis de soja, ou de misturas de soja e trigo, arroz, aveia ou centeio, em polipeptídios solúveis. São utilizadas proteases de *Aspergillus oryzae* e *A. soyae* para esse fim.

A soja é uma conhecida fonte de proteína vegetal, mas o uso dessa proteína é restrito devido à sua baixa funcionalidade. A hidrólise das proteínas de soja, utilizando-se preparações comerciais de protease, tem-se mostrado capaz de melhorar essas propriedades. A proteína modificada pode ser usada para o enriquecimento de vários alimentos.

Hidrolisados de glúten podem substituir sólidos do leite em vários produtos de panificação. Em massas para pão, acentuam o aroma e melhoram as características do miolo.

As indústrias farmacêutica e de alimentos vêm mostrando interesse em peptídios obtidos por hidrólise enzimática para uso como alimentos funcionais. Vários peptídios bioativos podem ser obtidos por hidrólise de caseína, glúten, soja, entre outras fontes protéicas. As funções biológicas mais estudadas desses peptídios são as atividades antioxidante, antibacteriana, antiinflamatória e estimulante do sistema imunológico.

Alguns peptídeos obtidos por hidrólise enzimática apresentam atividade antioxidante, antiinflamatória e/ou antibacteriana e são aplicados em alimentos funcionais. Hidrolisados de proteínas do leite são indicados para pessoas com problemas de alergia ao leite de vaca e para favorecer a absorção de cálcio no intestino.

Hidrolisados de caseína são usados em produtos antialérgicos, indicados para pessoas com intolerância às proteínas do leite de vaca, sem prejuízo do valor nutricional. Fosfopeptídios originados por hidrólise da α -caseína são usados para favorecer a absorção de cálcio pelo intestino humano.

Hidrolisados de albumina do ovo são aplicados como emulsificantes em alimentos formulados e hidrolisados de proteínas do soro, pela ação de tripsina, e de proteínas de soja, pela ação de alcalase, são usados para o enriquecimento de alimentos e rações.

Em alguns casos, a hidrólise libera peptídios cujo aminoácido C-terminal é hidrofóbico, principalmente

Peptídeos com aminoácido C-terminal hidrofóbico conferem sabor extraordinariamente amargo aos hidrolisados. Isso pode ser controlado pela aplicação de carboxipeptidases ou pela síntese de plasteína.

isoleucina, valina e fenilalanina, conferindo ao produto sabor amargo. Esse problema pode ser controlado pela utilização de carboxipeptidases, como a carboxipeptidase A de pâncreas de bovinos que apresenta alta especificidade para esse tipo de aminoácido. Outra enzima utilizada é a alcalase, uma protease comercial produzida por *Bacillus liqueniformis*, que apresenta alta especificidade por proteínas que possuem aminoácido hidrofóbico C-terminal, eliminando o sabor amargo.

Para que possam servir à sua função, os hidrolisados protéicos devem ter grau de hidrólise controlado e, para tanto, as condições de reação também deverão ser rigorosamente controladas. O pH ótimo de atividade da enzima deve ser observado e a concentração de substrato deve ser inferior a 10%, preferencialmente 1%, para prevenir a ocorrência da reação inversa denominada síntese de plasteína.

Síntese

A síntese de proteínas pode ser realizada de três formas distintas que podem ser empregadas em quantidade e escala variadas: síntese química, síntese enzimática e síntese via DNA recombinante.

Plasteína é o nome dado a moléculas semelhantes às proteínas naturais, cuja origem é a síntese catalisada por protease. No método enzimático, a formação da ligação peptídica é mediada por uma enzima em sua forma livre ou imobilizada. A reação pode ser realizada entre peptídeos e ésteres de aminoácidos ou via condensação entre segmentos peptídicos preparados previamente.

Como hidrolases, as proteases são capazes de realizar a reação inversa à hidrólise, em condições de baixa atividade de água no meio reacional. A síntese de plasteína é favorecida por alta concentração de substrato e pelo uso de solventes orgânicos, em meio reacional alcalino (pH de 9,0 a 10,0), o que torna os grupos amino mais favoráveis à formação de ligações, porém afeta pouco a atividade enzimática.

Síntese de plasteína – reação reversa à hidrólise que forma ligações peptídicas entre aminoácidos, seus ésteres ou peptídeos. É aplicada na incorporação de aminoácidos essenciais, na remoção do sabor amargo de pequenos peptídeos e no melhoramento das propriedades funcionais de proteínas.

As principais enzimas usadas em síntese de proteína são: termolisina, subtilisina, papaína e pepsina.

As proteases mais estudadas para esse fim são as de origem microbiana: termolisina (*Bacillus thermoproteolyticus*) e subtilisina (*B. subtilis*); a de origem vegetal: papaína; e a de origem animal: pepsina.

Esse tipo de reação pode ser usado na incorporação de aminoácidos essenciais a proteínas de baixo valor nutricional, na remoção de sabor amargo de peptídeos com aminoácido hidrofóbico C-terminal e na modificação de proteínas com o objetivo de melhorar propriedades funcionais.

Nesse último caso, um bom exemplo é a síntese de lipopeptídeos surfactantes pela reação da gelatina (colágeno desnaturado pelo calor), uma proteína altamente hidrofílica, com ésteres de leucina e ácidos graxos. Os ésteres podem ser ligados a frações de gelatina por síntese enzimática, gerando moléculas anfifílicas de alto poder emulsificante. Entretanto, problemas de custo impedem que cheguem ao mercado produtos comerciais obtidos dessa forma.

Reestruturação

Atualmente, existe grande interesse no desenvolvimento de produtos cárneos, seus derivados e produtos à base de proteína vegetal. O desenvolvimento de produtos reestruturados promove melhora tecnológica na textura, na aparência, no aroma e no sabor dos produtos, e por isso permite agregar-lhes mais valor.

A transglutaminase (EC 2.3.2.13) é uma enzima que atua na síntese de ligações cruzadas entre moléculas de proteína, gerando produtos chamados reestruturados. Ela não é uma protease, mas foi incluída neste capítulo por sua possibilidade de ampla aplicação futura.

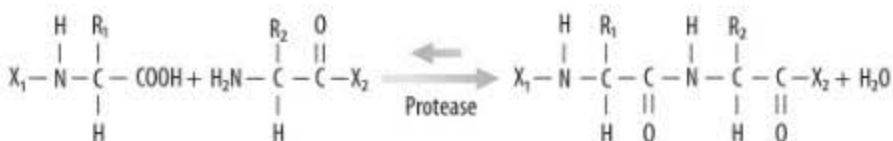


Figura 3.6 Síntese enzimática de proteína por inversão da hidrólise da ligação peptídica.

A transaminase é uma enzima que atua na síntese de ligações cruzadas entre proteínas, mas não é uma protease.

As ligações cruzadas formadas pela transglutaminase possibilitam a obtenção de produtos reestruturados favorecendo diversos aspectos sensoriais: textura, aparência, aroma e sabor.

As ligações cruzadas formadas pela transglutaminase são covalentes, bastante estáveis, intermoleculares e ocorrem entre resíduos dos aminoácidos glutamina e lisina, principalmente. Trata-se de uma reação de aciltransferase de um resíduo de glutamina de uma cadeia peptídica com uma variedade de aminas primárias, incluindo resíduos de lisina, de outra cadeia polipeptídica.

Os efeitos dessa reestruturação, juntamente com a sua capacidade de melhorar as propriedades físicas do alimento, aumentam consideravelmente o seu interesse tanto acadêmico quanto industrial. Essa enzima, que é obtida de *Streptoverticillium mobaraense*, tem sido aplicada com sucesso em tratamentos de alimentos de diferentes origens. O tratamento com transglutaminase parece favorecer aspectos sensoriais, como: aroma, sabor, aparência e textura. Outros benefícios já relatados foram: aumento da vida de prateleira, absorção de minerais e redução dos efeitos alérgicos de certos alimentos. A transglutaminase traz efeitos benéficos ao processamento de produtos cárneos, mas também pode ser aplicada a produtos de pescados e em proteína vegetal.

► Síntese de aspartame

Síntese de aspartame
— edulcorante não-calórico formado pelo ácido L-aspartico e pela L-fenilalanina. A síntese enzimática garante a manutenção da estereoespecificidade necessária à formação do sabor doce.

Aspartame é o nome comercial do edulcorante não-calórico formado pelo dipeptídeo L-ácido aspártico-L-fenilalanina (L-Asp-L-Phe-OMe). Seu poder adoçante é cerca de 200 vezes maior do que o da sacarose e está diretamente relacionado à configuração L dos aminoácidos envolvidos, e, portanto, a manutenção da estereoespecificidade é fundamental para o bom rendimento de síntese.

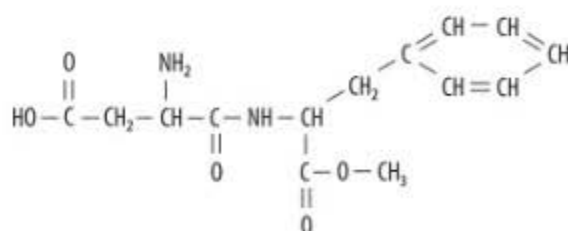


Figura 3.7 Molécula de aspartame.

Como a estereoespecificidade é necessária, a síntese enzimática por proteases é superior à síntese química. As maiores produtoras mundiais de aspartame utilizam proteases imobilizadas de *Bacillus thermoproteolyticus* (termolisina) no processo de síntese.

► Métodos de detecção da atividade

A metodologia para detecção da atividade de proteases mais aplicada determina a formação de produtos de hidrólise (solúveis em TCA) por espectrometria a 280nm.

A atividade proteolítica pode ser determinada em uma grande variedade de substratos: substrato natural (leite), substratos purificados (caseína, albumina, hemoglobina) ou sintéticos (arginina *p*-nitroanilina, azocaseína). No primeiro caso, avalia-se a atividade pela medida do tempo entre a adição da enzima ao leite e a precipitação do coágulo.

A maior parte das metodologias propostas utiliza caseína como substrato e mede a formação de produtos de hidrólise (aminoácidos livres, como tirosina e peptídios solúveis em solução de ácido tricloroacético) por espectrofotometria a 280nm ou por uso de reações colorimétricas, específicas para aminoácidos ou peptídios.

No caso de substratos sintéticos, em geral, o produto de hidrólise é facilmente mensurável pela alteração do pH do meio reacional ou pela alteração de cor que é quantificada por espectrofotometria. É importante notar que cada protease apresenta maior ou menor atividade, de acordo com o substrato utilizado e com a temperatura e o pH do ensaio, só sendo comparáveis resultados que levem em consideração todos esses fatores, além do tempo de reação e da agitação do meio reacional.

► Bibliografia

Leitura recomendada: Lyons, 1988; Whitaker, 1994, e Yamamoto, 1975.

- Adda, J.; Gripon, J. C.; Vassal, L. *The chemistry of flavour and texture generation in cheese*. Food Chemistry. V. 9, p. 115-129, 1982.
- Arai, S.; Fujimaki, M. *Enzymatic modification of proteins with special reference to improving their functional properties*. In: Fox, P. F. Food Enzymology — Vol. II, 83-104. Elsevier, Londres. 1991.

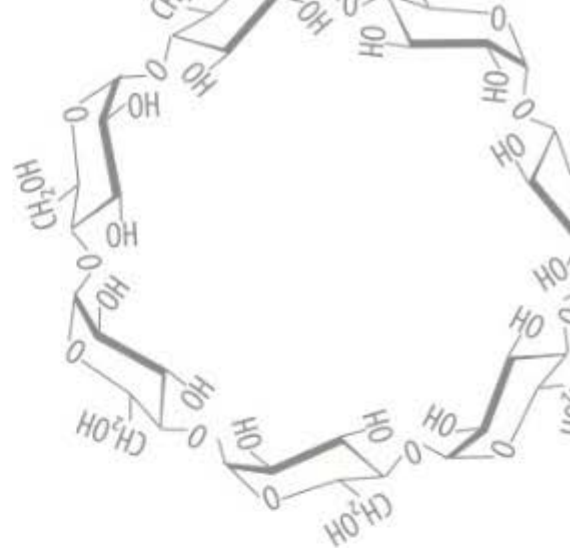
- Bailey, M. E.; Murdock Jr., F. A. *Endogenous and exogenous enzymes of meat*. In: Fox, P. F. Food Enzymology — Vol. II, 237-264. Elsevier, Londres. 1991.
- Barret, F. F. *Enzyme uses in the milling and baking industries*. In: Reed, G. Enzymes in Food Processing, 301-331. Academic Press, Nova York. 1975.
- Bass, E. J.; Cayle, T. *Beer*. In: Reed, G. Enzymes in Food Processing, 455-471. Academic Press, Nova York. 1975.
- Bernonholdt, H. F. *Meat and other proteinaceous foods*. In: Reed, G. Enzymes in Food Processing, 473-492. Academic Press, Nova York. 1975.
- Eskin, N. A. M. *Biotechnology: enzymes in food industry*. In: Eskin, Biochemistry of food, 467-539. Academic Press, Nova York. 1990.
- Etherington, D. J.; Bardsley, R. G. *Enzymes in meat industry*. In: Tucker, G. A. Enzymes in Food Processing, 144-189. Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall), Londres. 1995.
- Fox, P. F.; Grufferty, M. B. *Exogenous enzymes in dairy technology*. In: Fox, P. F. Food Emzymology — Vol. I, 219-270. Elsevier, Londres. 1991.
- Gibbs, B. F.; Zougman, A.; Masse, R.; Muligan, C. *Production and characterization of bioactive peptides from soy-hydrolisate and soy-fermentated food*. Food Research International. V. 37, p. 123-131, 2004.
- Grappin, R.; Rank, T. C.; Olson, N. F. *Primary proteolysis of cheese proteins during a ripening: a review*. Journal of Dairy Science. V. 68, p. 531, 1985.
- Gripon, J. C.; Monnet, V.; Lamberet, G.; Desmazeaud, M. J. *Microbial enzymes in cheese ripening*. In: Fox, P. F. Food Enzymology — Vol. I, 131-168. Elsevier, Londres. 1991.
- Hamer, R. J. *Enzymes in the baking industry*. In: Tucker, G. A. Enzymes in Food Processing, 190-222. Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall), Londres. 1995.
- Holt, C.; Horne, D. S. *The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implication for dairy technology*. Netherlands. Milk Dairy Journal, V. 50, p. 85-111, 1996.
- Kheadr, E. E.; Vuillemand, J. C.; El-Deeb, S. A. *Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening*. Food Research International. V. 36, p. 241-252, 2003.
- Kruif, C. G. *Casein micelle interactions*. International Dairy Journal, V. 9, p. 183-188, 1999.
- Laderoza, M.; Baldini, V. L. S. *Ênzimos e a Qualidade de Vegetais Processados — Manual Técnico*. ITAL. Campinas. 1991.

- Law, B. A.; Goodenough, P. W. *Enzymes in milk and cheese production*. In: Tucker, G. A.; Woods, L. F. J. *Enzymes in Food Processing*, 114-143. Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall), Londres. 1995.
- Lyons, T. P. *Proteinases in industry*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 8(2), 99-110. 1988.
- Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. *Microbial and Molecular Biology Reviews*. 62(3), 597-635. 1998.
- Richardson, G. H. *Dairy industry*. In: Reed, G. *Enzymes in Food Processing*, 362-396. Academic Press, Nova York. 1975.
- Slaughter, J. C.; Priest, F. G. *Significance and use of enzymes in brewing*. In: Fox, P. F. *Food Enzymology* — Vol. II, 47-68. Elsevier, Londres. 1991.
- Sod, V. K.; Kosokowski, F. V. *Accelerated cheddar cheese ripening by added microbial enzymes*. *Journal of Dairy Science*, 62, 1865-1872. 1979.
- Veisseyre, R. *Lactología Técnica* (Technologie du Lait). Acribia, Zaragoza. 1988.
- Walstra, P. *Casein sub-micelles: do they exist?* *International Dairy Journal*, V. 9, p. 189-192, 1999.
- Whitaker, J. R. *The proteolytic enzymes*. In: *Principles of Enzymology for the Food Science*, 469-498. Marcel Dekker, Nova York. 1994.
- Yamamoto, A. *Proteolytic enzymes*. In: Reed, G. *Enzymes in Food Processing*, 124-179, Academic Press, Nova York. 1975.
- Zhu, Y.; Rinzema, A.; Tramper, J.; BOL, J. *Microbial transglutaminase — a review of its production and application in food processing*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 44, p. 277-282, 1995.



4

Lipases



Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 108
- ▶ Características gerais e modo de ação, 109
- ▶ Fontes e principais características, 113
- ▶ Importância em alimentos:
rancidez hidrolítica, 114
- ▶ Aplicação industrial, 115
- ▶ Outras aplicações, 121
- ▶ Métodos de detecção da atividade, 122
- ▶ Bibliografia, 123

► Introdução

▼

Lipases catalisam a hidrólise e óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol.

Lipases, triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são esterases que apresentam muito maior atividade sobre substratos insolúveis em água. São enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Essas enzimas têm papel fundamental no metabolismo de lipídios dos seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reserva energética e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares.

Os aspectos biológicos e fisiológicos e a aplicação industrial de enzimas lipolíticas têm sido bastante estudados, e, nos últimos anos, a pesquisa sobre lipases tem sido intensificada por, principalmente, três motivos:

- São enzimas que apresentam uma forma de ação incomum — solúveis em água, mas catalisam reações que envolvem substratos lipofílicos — e, assim, sua estrutura molecular, muitas vezes composta por uma “tampa” que protege o sítio ativo predominantemente hidrofóbico da enzima, tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa;
- Apresentam grande relevância médica, principalmente em relação a aterosclerose e a hiperlipidemia, uma vez que alguns produtos de sua atuação — ácidos graxos livres e diacilgliceróis — têm papel fundamental na regulação e no metabolismo celular;
- A descoberta, relativamente recente, da capacidade das lipases de catalisar reações de síntese e sua surpreendente estabilidade em diversos solventes orgânicos abriu inúmeras possibilidades no campo da síntese química, em que as diferentes seletividades de lipases de várias fontes, aliadas às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam, apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais.

▼

Lipases são esterases que apresentam maior atividade sobre substratos insolúveis em água. Catalisam a hidrólise de óleos e gorduras e também a reação inversa de síntese, entre outras.

A função biológica das lipases é hidrolisar ésteres (Figura 4.1), especialmente triglicerídios. No entanto, lipases também são capazes de catalisar reações de síntese, dependendo, para isso, de baixa atividade de água no meio reacional (Figura 4.2).

► Características gerais e modo de ação

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina-hidrolases (EC 3.1.1.3). Os triglicerídios (principais componentes de óleos e gorduras) são seus substratos naturais, com conseqüente liberação de diglicerídios, monoglicerídios, glicerol e ácidos graxos. Independentemente

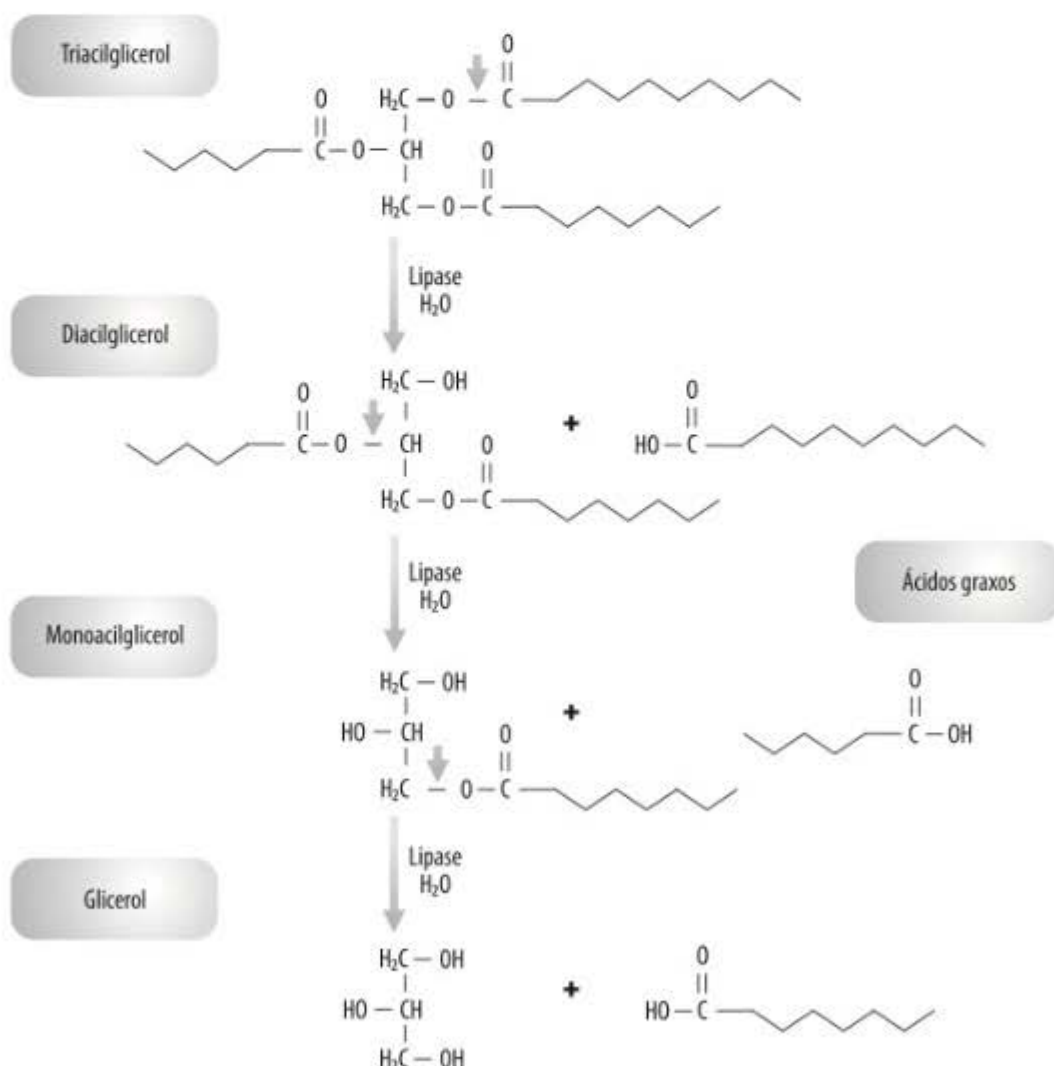


Figura 4.1 Hidrólise de triglicerídeo por lipase.

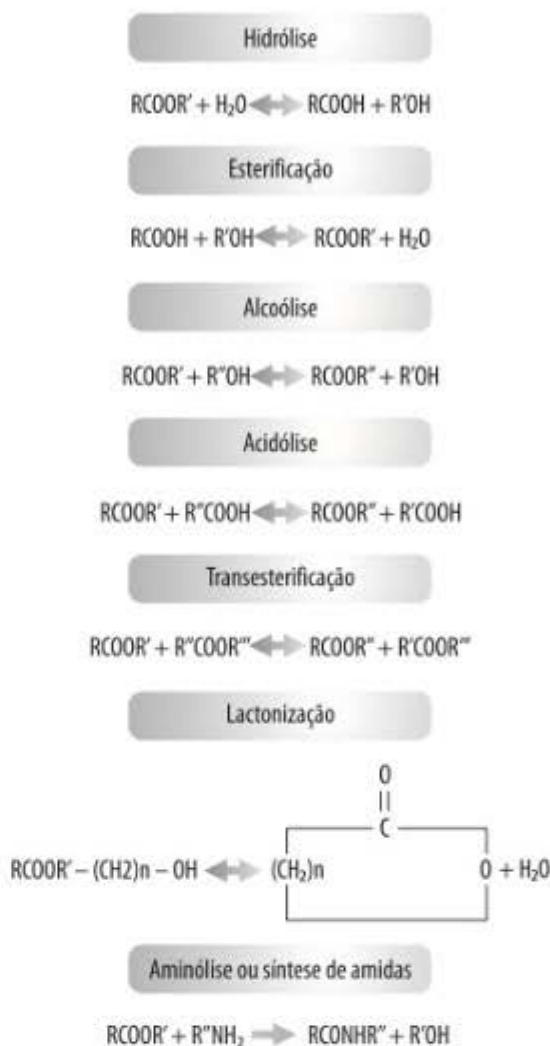


Figura 4.2 Reações catalisadas por lipases.

de diferenças na massa molecular, na seletividade de substratos, na resposta a ativadores e inibidores, dentre outros, a grande maioria das lipases apresenta estrutura similar, composta por diversas estruturas β -pregueadas em paralelo (pelo menos 5), separadas por trechos de α -hélices, com peptídios helicoidais que cobrem boa parte de sua superfície. Diferentes graus de homologia na estrutura primária são encontrados em lipases, entretanto uma seqüência é excepcionalmente bem conservada: o pentapeptídio Gly-X-Ser-X-Gly. O grau de conservação dessa seqüência e a perda de atividade de lipases que tem o resíduo de serina modificado ou suprimido são fortes indicadores de que esse trecho esteja localizado no sítio catalítico dessas enzimas. Além disso, a conformação tri-

Lipases são serina-hidrolases cujo sítio ativo se localiza dentro de uma cavidade hidrofóbica onde se aloja o ácido graxo de modo a posicionar a ligação éster alinhada com a região catalítica.

dimensional do pentapeptídeo também é importante para catálise. Em geral, ele se arranja, formando um “cotovelo” em ângulo bem agudo, o que só é alcançado quando os resíduos localizados nas posições -2 e +2 em relação ao resíduo de serina têm substituições pequenas, o que explica a constante existência de glicina nessas posições. Além desses aminoácidos, estão presentes em muitos casos, no sítio catalítico das lipases, resíduos de histidina e de ácido aspártico e/ou ácido glutâmico. Nas lipases, o sítio ativo fica localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica, que pode ser superficial ou profunda de acordo com a homologia a que pertencem. Nessa cavidade, aloja-se o ácido graxo, para posicionar a ligação éster alinhada com o sítio ativo. A cavidade é geralmente protegida por uma “tampa” polipeptídica que se abre, expondo o sítio ativo, quando a lipase encontra-se na interface polar/apolar. Isso explica por que a grande maioria das lipases tem sua atividade muito aumentada na interface óleo/água, sobre substratos insolúveis, ao contrário de outras esterases.

As lipases são, em geral, classificadas de acordo com o tipo de especificidade que apresentam: *regiosseletividade*, *seletividade de substrato* e *enantioseletividade*.

Regiosseletividade. É a propriedade de reconhecer a mesma ligação química em diferentes regiões do substrato e reagir apenas com algumas delas.

- Lipases não-específicas: hidrolisam igualmente ligações éster nas posições 1(3) e 2 do triglicerídeo (ésteres primários e secundários);
- Lipases 1(3)-específicas: hidrolisam apenas ésteres primários, isto é, nas posições 1(3) do triglicerídeo. Podem ocasionar hidrólise total de óleos e gorduras a ácidos graxos e glicerol, pois os ácidos ligados à posição 2 sofrem isomerização, passando a ocupar as posições 1(3), durante o processo.

Não são conhecidas lipases 2-específicas, embora uma lipase produzida por *Candida antarctica* hidrolise essa posição ligeiramente mais rápido que as outras.

Lipases são classificadas em não-específicas ou 1(3)-específicas de acordo com sua regiosseletividade. Apresentam ainda seletividade de substrato de acordo com o tamanho e o grau de insaturação dos ácidos graxos e enantioseletividade, reagindo mais rapidamente com um enantiômero do que com os outros.

Seletividade de substrato. Propriedade de reconhecer um tipo de ácido graxo e hidrolisar as ligações nas quais ele está envolvido com exclusividade ou com maior rapidez.

- Em relação ao tamanho da cadeia carbônica: ácidos graxos de cadeia curta (até 10C), média (de 10 a 14C) ou longa (acima de 16C);
- Em relação ao grau de insaturação do ácido graxo: saturado, mono-, di- ou poliinsaturado. Muitas vezes, a localização da(s) insaturação(ões) também determina a atividade de uma lipase sobre um substrato.

Enantioseletividade. Propriedade de reagir com um determinado isômero do substrato exclusiva ou mais rapidamente do que com outros isômeros da mesma substância.

A grande maioria das enzimas apresenta algum grau de enantioseletividade, embora em lipases essa caracte-

Tabela 4.1 Seletividade de lipases de diferentes fontes, segundo Xu (2000).

Fonte da lipase	Seletividade de substrato	Regioseletividade
<i>Aspergillus niger</i>	C, M, L	1,3 >> 2
<i>Candida lipolytica</i>	C, M, L	1,3 > 2
<i>Humicola lanuginosa</i>	C, M, L	1,3 >> 2
<i>Mucor javanicus</i>	M, L >> L	1,3 > 2
Pancreática	C > M, L	1,3
<i>Penicillium roquefortii</i>	C, M >> L	1,3
Pré-gástrica	C, M >> L	1,3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M, L > C	1,3 > 2
<i>Pseudomonas</i> sp	C, M, L	1,3 > 2
<i>Rhizomucor miehei</i>	C > M, L	1 > 3 >> 2
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C, M > L	1,3
<i>Rhizopus delemar</i>	M, L >> C	1,3 >> 2
<i>Rhizopus javanicus</i>	M, L > C	1,3 > 2
<i>Rhizopus niveus</i>	M, L > C	1,3 > 2
<i>Rhizopus oryzae</i>	M, L > C	1,3 >>> 2

C: ácidos graxos de cadeia curta; M: de cadeia média; L: de cadeia longa

ristica seja, geralmente, bastante acentuada. Na Tabela 4.1 estão relacionadas algumas lipases e suas seletividades.

► Fontes e principais características

Lipases são produzidas por todos os seres vivos podendo ser encontradas em células e secreções de animais, vegetais e microrganismos.

Entre as lipases animais, a pancreática é a mais importante, sendo uma lipase 1(3)-específica com preferência por ácidos graxos de cadeia curta. As lipases vegetais são mais abundantes em sementes oleaginosas e pouco comercializadas.

As lipases são produzidas por, virtualmente, todos os seres vivos, podendo ser encontradas em células e secreções de animais, vegetais e de diferentes microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). Embora a lipase mais estudada até hoje tenha sido a pancreática, do ponto de vista industrial as lipases microbianas permitem produção em maior escala e podem mais facilmente ser expressas, via clonagem, em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação. Além disso, pela variedade de microrganismos existentes, há uma gama de lipases com características diferenciadas de atuação. Ainda existe a possibilidade de se induzir a produção de lipases, em alguns microrganismos, de acordo com a composição do meio fermentativo. Em geral, a produção de lipases é inibida por açúcares simples (glicose, frutose) ou glicerol e é estimulada por meios que contêm ácidos graxos livres, óleos e gorduras ou polissacarídios.

Nos animais superiores, as lipases estão relacionadas principalmente à digestão de lipídios ingeridos na dieta e à mobilização dos tecidos adiposos (de reserva). A lipase pancreática produzida pelo pâncreas e introduzida no duodeno, durante o processo digestivo, é a mais importante.

Em vegetais, as lipases são mais abundantes em sementes oleaginosas, determinantes durante o processo de germinação, mas existem em vários outros tecidos e podem ser encontradas, por exemplo, no látex do mamoeiro.

Lipases são ainda produzidas por uma grande quantidade de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) e estão envolvidas no processo de aquisição de energia desses microrganismos.

Atualmente, apenas lipases de origem animal ou microbiana têm aplicação industrial; essas últimas predominam no mercado.

As lipases dos gêneros *Candida* e *Rhizomucor* são as de maior importância comercial, sendo as de levedura lipases não-específicas e as de fungos filamentosos lipases 1(3)-específicas com preferência por ácidos graxos de cadeia média.

Rancidez hidrolítica acontece quando, por ação de lipases sobre os triacilgliceróis dos alimentos, são gerados ácidos graxos livres.

Se estes são de baixa massa molecular, eles são voláteis e causam aroma desagradável no produto. Os produtos mais afetados são laticínios, mas grãos e seus derivados também podem sofrer deterioração pelo ranço hidrolítico. Em óleos, a alta acidez é considerada um problema grave de qualidade.

► Lipases animais

A lipase pancreática suína é a lipase de uso comercial mais estudada. Enzima 1(3)-específica, com ligeira preferência por ácidos graxos de cadeia curta. Tem pH ótimo de atuação, de 7,0 a 9,0 (característico do intestino), e é fortemente ativada por NaCl.

► Lipases microbianas

Origem fúngica: *Candida antarctica* é a principal levedura produtora de lipases de uso industrial. Suas lipases são inespecíficas, com ligeira preferência pela posição 2. Apresentam altíssima estabilidade térmica e boa enantioselectividade com uma grande variedade de substratos. O nome comercial é Chyrozyme®. Outras espécies do gênero *Candida* (*C. cylindracea* e *C. rugosa*) também são boas produtoras de lipases inespecíficas. Uma lipase fúngica de considerável interesse é a produzida por *Geotrichum candidum*. Esta enzima é bastante específica para o ácido oléico; e é por esse motivo conhecida como lipase cis-9-ácido graxo específica.

Dentre os fungos filamentosos, os gêneros *Rhizopus*, *Rhizomucor* e algumas espécies de *Aspergillus* são produtores de lipases 1(3)-específicas com preferência por ácidos graxos de até 12 carbonos. O fungo *Rhizomucor miehei* é o de maior aplicação industrial. Sua lipase é comercializada, imobilizada em resina fenólica, para diversos usos, sob o nome comercial de Lipozyme®.

Origem bacteriana: Os gêneros *Pseudomonas* e *Staphylococcus* produzem lipases de aplicação industrial; este último não é indicado para uso em alimentos pela possível produção de toxinas.

► Importância em alimentos: rancidez hidrolítica

As lipases são responsáveis por um tipo de deterioração dos alimentos, conhecido como “rancidez hidrolítica”. Consiste na hidrólise de triglicerídios presentes no alimento e na liberação de ácidos graxos voláteis e de

odor desagradável, de ranço. A rancidez hidrolítica é mais comum em laticínios, uma vez que o leite possui lipases nativas e sua gordura contém grande quantidade de ácido butírico (4C), ácido capróico (6C) e ácido caprílico (8C) que são ácidos graxos de baixo peso molecular e com odor extremamente desagradável. No entanto, produtos de origem vegetal, como grãos, farinhas e farelos também podem deteriorar-se por conterem lipases. Para que evite a ocorrência desse tipo de deterioração, é necessária uma operação de aquecimento para inativação térmica (branqueamento) das lipases responsáveis pela rancidez hidrolítica.

► Aplicação industrial

► Maturação acelerada de queijos

É feita pelo uso de lipases microbianas (em geral, fúngicas: *Penicillium roquefortii*, *P. camemberti*), de inóculo microbiano (o microrganismo, além de produzir as enzimas necessárias, ainda garante a aparência típica do produto) e, em alguns casos, de lipases animais (lipase pré-gástrica de cabrito: queijo parmesão), em conjunto com proteases. As lipases liberam ácidos graxos que dão o sabor e o aroma específico dos diferentes queijos. O uso de enzimas isoladas, em conjunto com o inóculo microbiano ou não, reduz o tempo de maturação de diversos queijos, de vários meses para apenas algumas semanas. O custo de produção fica reduzido, sem prejuízo das características e da qualidade final do produto.

► Panificação

A hidrólise dos triglicerídios da massa leva à formação de glicerídios parciais (mono- e diglicerídios) que têm propriedades emulsificantes (por existirem uma fração polar e uma apolar na molécula). A capacidade de retenção de ar da massa aumenta e gera um produto com melhor textura (mais fofo). Além disso, há também aumento da capacidade de retenção de água na massa, o que retarda a sinérese, prolongando a vida de prateleira

▼

Maturação de queijos – lipases liberam ácidos graxos responsáveis por formação do aroma e sabor característicos de certos queijos finos.

▼

Em pães, lipases produzem glicerídios parciais que aumentam a retenção de ar e de água, promovendo melhor textura e retardando a sinérese.

do pão. Essa ação permite a fabricação de pães *light*, sem a adição de gorduras, uma vez que as lipases são capazes de transformar os próprios lipídios da massa em agentes emulsificantes.

► Produção de óleos e gorduras estruturados

Óleos e gorduras estruturados são produtos que contêm triglicerídios sintetizados artificialmente, com o objetivo de alterar as concentrações relativas de seus ácidos graxos constituintes, assim como a posição, no esqueleto de glicerol, que cada grupo acil ocupa. Esses produtos apresentam vantagens dos pontos de vista funcional e/ou nutricional sobre os óleos e gorduras naturais. A obtenção de triglicerídios estruturados é feita por interesterificação química ou enzimática de dois diferentes óleos ou de óleo e ácidos graxos livres ou na forma metilada. A síntese química, embora seja uma tecnologia há muito dominada pela indústria, apresenta várias desvantagens em relação ao processo enzimático: obtenção de produtos inespecíficos, uso de altas temperatura e pressão — o que gera subprodutos de cor e odor indesejáveis e implica várias etapas de purificação subseqüentes. O uso de enzimas 1(3)-específicas garante a obtenção de produtos específicos, de acordo com os substratos utilizados, o que vem a ser de grande importância na aplicação funcional e nutricional dos triglicerídios estruturados.

Uso nutricional

Estudos recentes sobre absorção de ácidos graxos pelo intestino humano, principalmente de lactentes, levaram à conclusão de que os ácidos graxos de cadeia longa, tanto saturados quanto insaturados, são mais prontamente absorvidos quando na forma de monoglicerídios. Uma vez que a lipase pancreática é uma lipase 1(3)-específica, equivalentes de gordura do leite humano (ricos em ácido palmítico) e óleos com fins terapêuticos (que contêm ácidos graxos essenciais e poliinsaturados) devem ser sintetizados, de modo a conter esses ácidos graxos na posição 2 do triglicerídio e grupos acil de cadeia média

Óleos e gorduras estruturados são sintetizados artificialmente com composição de ácidos graxos e sua localização no glicerol previamente determinada.

Apresentam vantagens dos pontos de vista nutricional e tecnológico.

Sua produção é atingida por esterificação, alcoólise ou acidólise catalisada por lipases.

Para melhorar a absorção de ácidos graxos de cadeia longa estes devem se localizar sempre na posição 2 do triacilglicerol. Este tipo de produto estruturado é aplicado como substituinte de gordura do leite humano em leites chamados maternizados.

ou curta (mais facilmente absorvidos na forma livre) nas posições 1 e 3. Alguns óleos e gorduras estruturados já estão disponíveis comercialmente; um exemplo é o Betapol®, marca comercial da Unilever para um equivalente da gordura de leite humano com valor nutricional muito próximo ao natural, produzido com tecnologia enzimática.

Substituintes da manteiga de cacau podem ser obtidos por reação mediada por lipases entre o azeite de oliva e os ácidos palmítico e esteárico.

Uso tecnológico

Manteiga de cacau. É constituída principalmente pelos seguintes triglicerídios: POP, POSt e StOSt (P = palmítico; O = oléico; St = esteárico), que juntos correspondem a quase 80% da composição da gordura. Essa composição confere à manteiga de cacau um ponto de fusão muito específico, isto é: toda a gordura líquida liquefaz-se ao mesmo tempo e em uma temperatura de 35 a 37°C (temperatura do corpo humano), propriedade muito rara das gorduras naturais e que garante ao produto formulado com essa manteiga a característica de “derreter na boca”. No entanto, o fornecimento de manteiga de cacau no mercado internacional é muito instável e os preços, muito variáveis. Foi então desenvolvido um processo enzimático para produção de substituintes da manteiga de cacau. O processo parte de um óleo rico em triglicerídios que contenham ácido oléico na posição 2 (azeite de oliva, por exemplo) e promove a interesterificação do óleo com os ácidos palmítico e esteárico, por meio de uma lipase 1(3)-específica.

► Produção de margarina

A metodologia convencional para produção de margarina é a hidrogenação química parcial de um óleo vegetal, usando catalisadores metálicos. Parte das insaturações dos ácidos graxos do óleo é hidrogenada, gerando uma gordura sólida a temperatura ambiente, porém com grau de insaturação suficiente para conferir cremosidade e boa espalhabilidade em temperatura de refrigeração, característica mais desejável das margarinas. Entretanto, nesse processo, são formados ácidos graxos transinsaturados,

O uso de interesterificação enzimática entre um óleo e uma gordura possibilita a obtenção de margarinas livres de gorduras trans.

Surfactantes não-iônicos são agentes tensoativos com propriedades conservantes em alimentos e fármacos.

Entre os surfactantes não-iônicos mais aplicados estão os monoacilgliceróis, ésteres de açúcar e a lisolecitina.

que não são reconhecidos pelas enzimas do metabolismo humano e podem gerar diferentes problemas de saúde. Além disso, resíduos dos catalisadores são inevitáveis no produto final e esses metais também podem provocar danos à saúde do consumidor. Uma metodologia alternativa é a produção de margarina por interesterificação de um óleo com uma gordura, usando lipases como catalisadores. Assim, com a mistura de ácidos graxos saturados e insaturados nos triglicerídios resultantes, pode-se obter um produto com a textura desejada, sem o uso da hidrogenação. Um dos processos mais aplicados é a interesterificação da fração líquida com a sólida da gordura de dendê (palma).

► Produção de surfactantes não-iônicos

Surfactantes são substâncias capazes de promover a mistura de componentes imiscíveis (como óleo e água) pela redução da tensão superficial e formação de micelas. Para que possam atuar como tensoativos, os emulsificantes devem ter uma parte de sua molécula com características polares (fração que fica em contato com a água) e uma parte apolar (que fica em contato com a gordura ou com o ar).

Surfactantes não-iônicos, como monoglicerídios e ésteres de açúcar, encontram extensa aplicação na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos não apenas por sua eficiência como agentes tensoativos, mas também por seu caráter atóxico e por sua ação como agentes conservantes. A produção por via química não é muito satisfatória, pois os catalisadores alcalinos utilizados e as altas temperaturas de reação provocam a formação de produtos secundários indesejados. Além do custoso processo de purificação, a produção desses surfactantes por via química apresenta baixo rendimento (de 30 a 60%).

Monoglicerídios. A produção por via enzimática de monoglicerídios pode ser alcançada por diferentes meios:

- Hidrólise parcial de triglicerídios, usando-se lipases 1(3)-específicas — nesse caso, a maior dificuldade

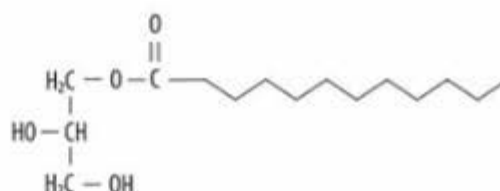


Figura 4.3 Estrutura da monolaurina.

consiste em se evitar a isomerização dos grupos acil da posição 2 para a posição 1(3);

- Esterificação do glicerol com ácidos graxos livres ou metilados;
- Glicerólise: reação de triglicerídios com glicerol.

Nos dois últimos casos, são duas as dificuldades a serem contornadas: a eficiente homogeneização dos substratos e a remoção de água do meio reacional. Vários processos já foram propostos nesse sentido; alguns alcançaram rendimentos de até 90% em monoglicerídios.

Ésteres de açúcar. São compostos por um mono- ou dissacarídeo esterificado em 1, 2 ou 3 hidroxilas com ácidos graxos. Obtidos por síntese entre açúcares e ácidos graxos.

Lisolecitina. Produto obtido pela hidrólise da lecitina (remoção de um dos dois ácidos graxos da molécula) pelo uso de fosfolipases (lipases específicas para fosfolipídios). A lisolecitina possui maior fração polar que a lecitina, o que lhe proporciona uma maior capacidade emulsificante e maiores possibilidades de aplicação em alimentos e cosméticos.

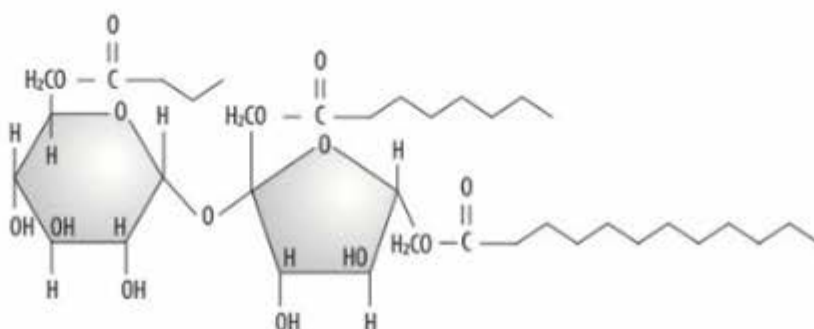


Figura 4.4 Éster de sacarose e ácidos butírico, caprílico e láurico.

A obtenção dos diversos surfactantes não-iônicos pode ser atingida pela aplicação de lipases e de fosfolipases, por hidrólise ou pela reação inversa (síntese).

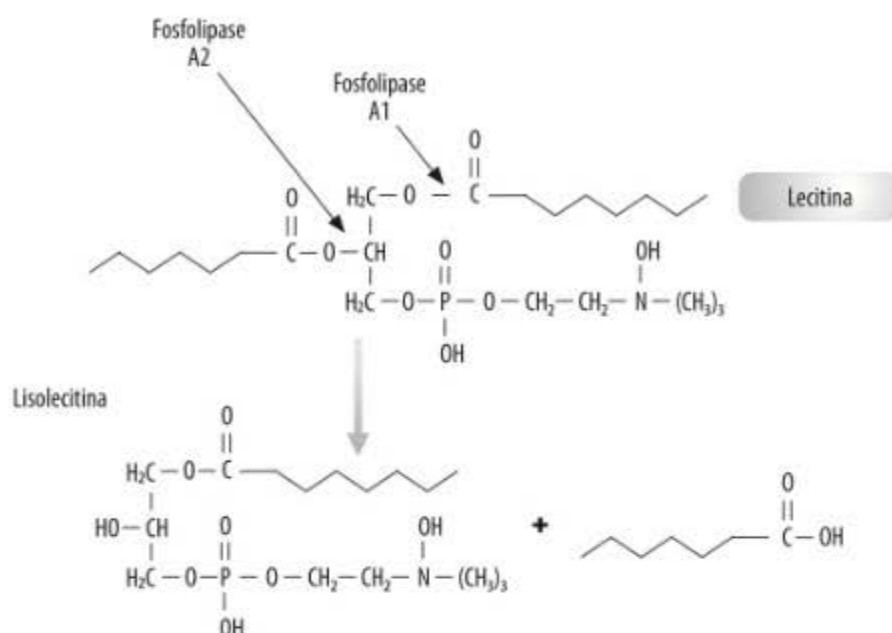


Figura 4.5 Lecitina e lisolectitina.

Alguns compostos de aroma podem ser obtidos pela ação de lipases na esterificação entre alcoóis e ácidos de baixa massa molecular. Esses produtos são considerados "aromas naturais".

► Síntese de aromas

Uma fração significativa dos aromas de alimentos é constituída por ésteres voláteis (de baixo peso molecular), que podem ser sintetizados a partir de um álcool e de um ácido, com uso de lipases. São duas as principais vantagens do uso dessa metodologia:

- Produtos obtidos por síntese enzimática são considerados "naturais", o que evita que formulações que contenham esses aromas sejam rotuladas como "aromatizadas artificialmente", uma característica que vem adquirindo cada vez maior importância para os consumidores;
- Em muitos casos, apenas um isômero apresenta o aroma desejado. Pela síntese enzimática, é possível produzir-se apenas esse isômero, o que aumenta o poder aromatizante do produto e reduz sua dosagem e seu custo. Uma outra possibilidade é o uso de lipases para remover, de misturas racêmicas, os isômeros indesejados, deixando apenas aqueles com aroma característico (usado na purificação de mentol).



Figura 4.6 Estrutura do butirato de etila e do acetato de isoamila.

Exemplos de compostos de aroma sintetizados por lipases: butirato de etila (aroma de morango); acetato de isoamila (aroma de banana).

► Outras aplicações

► Produção de compostos opticamente ativos e resolução de racematos

Nos seres vivos, a atividade biológica de uma droga é geralmente dependente da estereoquímica do composto em questão. Assim, enquanto um enantiômero apresenta um efeito benéfico, o outro pode ser tóxico ou inócuo. Alguns exemplos dos diferentes efeitos das formas enantioméricas das drogas, nos seres vivos, podem ser observados na Tabela 4.2.

Em 1992, o FDA (Food and Drug Administration) adotou um programa no qual as drogas racêmicas enfrentariam processos muito mais longos e complexos de aprovação para venda, nos EUA, do que as drogas quirais. A partir desse ano, a grande maioria das indústrias farmacêuticas tem procurado metodologias eficientes para produção de compostos opticamente puros e para resolução de racematos. Em razão de sua enantiosseletividade, as lipases têm sido empregadas em vários processos desse

Em virtude de sua enantiosseletividade, lipases são aplicadas na obtenção de compostos opticamente puros para uso como fármacos e em química fina.

Tabela 4.2 Efeito das formas enantioméricas de alguns fármacos.

Fármaco	R-enantiômero	S-enantiômero
Carmitina	Eficaz no tratamento de doenças cardíacas de ordem muscular	Tóxico
Ibuprofeno	Inativo	Antiinflamatório
Penicilamina	Tóxico	Antiartrítico
Talidomida	Sedativo	Provoca a morte ou a deformação do feto

tipo mediante hidrólise em meio aquoso ou síntese em meio orgânico.

As lipases em química fina são aplicadas na produção de compostos quirais puros para utilização como intermediários em sínteses químicas e como padrões para análises cromatográficas.

► Formulação de detergentes

A indústria de detergentes é o destino da maior parte das lipases produzidas comercialmente, pois a utilização de formulações que contêm lipases, amilases e proteases reduz expressivamente o tempo e a temperatura de lavagem, resultando em um processo mais eficiente com menor gasto de energia. Entretanto, para esse determinado fim, as lipases devem apresentar características específicas; tais como: atividade a temperaturas em torno de 60°C e valores de pH alcalinos, resistência a surfactantes e à proteólise.

► Tratamento de efluentes

Lipases são utilizadas em lodo ativado e em outros processos aeróbios de tratamento de efluentes de diversas indústrias (p. ex., alimentos, couro, abatedouros), na remoção da camada lipídica que flota, dificultando a aeração dos tanques.

Outras aplicações industriais de lipases estão relacionadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Aplicações de lipases — miscelânea.

<i>Indústria</i>	<i>Aplicação</i>
<i>Cosméticos</i>	Auxiliar na penetração de produtos para “permanentes” de cabelos
<i>Couros</i>	Remoção de gordura residual das peles
<i>Farmacêutica</i>	Síntese de amidas precursoras de análogos da penicilina
<i>Medicina</i>	Auxiliar na digestão Análises clínicas
<i>Papel e celulose</i>	Lise de material gorduroso da pasta de celulose Remoção de tinta em papel reciclado
<i>Química</i>	Síntese de ésteres e poliésteres usados como lubrificantes
<i>Rações</i>	Melhoria da palatabilidade
<i>Tecidos</i>	Refino de seda

Em formulações de detergentes, lipases diminuem o tempo e a temperatura de lavagem, reduzindo o gasto de energia.

► Métodos de detecção da atividade

A atividade de lipases pode ser determinada em óleos e gorduras naturais, na presença ou ausência de estabilizantes (como a goma arábica). Em muitos casos, é aconselhável acrescentar ao meio reacional algumas pérolas de vidro que auxiliam na homogeneização do mesmo e a reação deve sempre ser conduzida sob agitação. A atividade da enzima irá variar com o tipo de substrato usado e com as condições de reação (temperatura, pH, tempo e agitação, além do uso de auxiliares de homogeneização). Em alguns casos, é interessante utilizar-se a medida de atividade de esterase para estimar a atividade lipolítica. Nesses casos, são usados substratos sintéticos solúveis (triacetina, p. ex.) ou agentes surfactantes. Nas metodologias mencionadas acima, a atividade é detectada e quantificada pela titulação dos ácidos graxos liberados, por ação da lipase, com NaOH ou KOH, na presença de fenolftaleína ou de outro indicador. Há ainda a possibilidade de se utilizarem substratos sintéticos cromogênicos (p. ex., ésteres de *p*-nitrofenol e ácidos graxos), cuja hidrólise pode ser quantificada por espectrofotometria de luz visível.

▼

O método clássico de determinação da atividade de lipases se baseia na titulação dos ácidos graxos liberados, na presença de um indicador.

► Bibliografia

- Bailey, J.E.; Ollis, D.F. *Applied Enzyme Catalysis*. In: *Biochemical Engineering Fundamentals*, p. 157-227. McGraw-Hill, Nova York. 1986.
- Beisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. *Methods for Lipase Detection and Assay: a Critical Review*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, p. 133-153. 2000.
- Borgston, B.; Brockman, H.L. *Lipases*. Elsevier, Amsterdam. 1984
- Bornscheuer, U.T. *Lipase Catalysed Synthesis of Monoacylglycerols*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 578-586. 1995.
- Cao, L.; Bornscheuer, U.T.; Schmid, R.D. *Lipase-Catalysed Solid Phase Synthesis of Sugar Esters*. *Fett/Lipid*, 10: 332-335. 1996.
- Christen, P.; Mungia, L.A. *Enzymes and Food Flavor — a Review*. *Food Biotechnology*, 8(2,3): 167-190. 1994.
- Cygler, M.; Schrag, J.D.; Ergon, F. *Advances in Structural Understanding of Lipases*. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 10: 143-184. 1992.

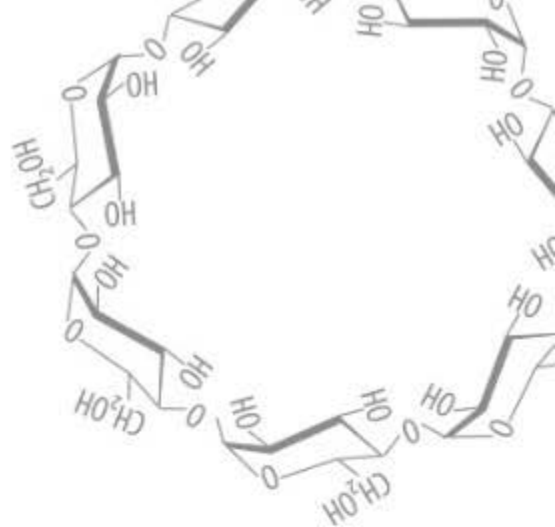
▼

Leitura recomendada: Borgston & Brockham, 1984; Poroske, 1984.

- Gandhi, N.N. *Applications of Lipase*. Journal of the American Oil Chemists Society, 74(6): 621-634. 1997.
- Gehartz, W. *Industrial Uses of Enzymes*. In: Enzymes in Industry — production and Application, p. 77-148. VCH, Weinheim. 1990.
- Godfrey, T.; Reichelt, J. *Industrial Applications*. In: Industrial Enzymology — Applications of Enzymes in Industry, p. 170-465. The Nature Press, Londres. 1983.
- Haas, M.J.; Joerger, R.D. *Lipases of the Genera Rhizopus and Rhizomucor: Versatile Catalysts in Nature and the Laboratory*. In: Hui, Y.H.; Khachatourians, G.G. Food Biotechnology: Microorganisms, p. 549-588. VCH. Nova York. 1995.
- Iwasaki, Y.; Yamane, T. *Enzymatic synthesis of structured lipids*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 10: 129-140. 2000.
- Kinsella, J.E.; Hwang, D.H. *Enzymes of Penicillium roqueforti Involved in the Biosynthesis of Cheese Flavours*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 8: 192-228. 1976.
- Mcneil, G.P.; Shimizu, S.; Yamane, T. *High-Yield Enzymatic Glycolysis of Fats and Oils*. Journal of the American Oil Chemists Society, 68(1): 1-5. 1991.
- Poroske, L.H. *Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry*. Journal of the American Oil Chemists Society, 61(11): 1758-1765. 1984.
- Rozendaal, A.; Macrae, A.R. *Interesterification of Oils and Fats*. In: Gunstone, F.D.; Padley, F.B. Lipids Technologies and Applications, p. 233-263. Marcel Dekker Inc., Nova York. 1997.
- Shukla, V.K.S. *Confectionary Fats*. In: Hamilton, R.J. Developments in Oils and Fats, p. 66-94. Blakie Academic and Professional, Londres. 1996.
- Wiseman, A. *Industrial Practice with Enzymes: Application and Sources of Industrial Enzymes*. In: Wiseman, A. Handbook of Enzyme Biotechnology, p. 252-259. Ellis Horwood Ltd., Chichester. 1975.
- Xu, X. *Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalysed Reactions: a Review*. European Journal of Lipid Science and Technology, 28: 287-303. 2000.
- Zhang, H.; Xu, X.B.; Mu, H.L.; Nilsson, J.; Adler-Nissen, J.; Hoy, C.E. *Lipozyme-Catalyzed Interesterification for the Production of Margarine Fats in a 1Kg Scale Stirred Tank Reactor*. European Journal of Lipid Science and Technology, 102(6): 411-418. 2000.

5

Oxidoreductases



Severino Matias de Alencar
Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 126
- ▶ Polifenol-oxidases, 127
- ▶ Peroxidases, 136
- ▶ Lipoxigenases, 140
- ▶ Catalases, 143
- ▶ Glicose-oxidases (EC 1.1.3.4), 145
- ▶ Xantina-oxidases, 147
- ▶ Ascorbato-oxidases, 148
- ▶ Métodos de detecção da atividade, 149
- ▶ Bibliografia, 151

► Introdução

Oxidoredutases são enzimas que realizam reações de oxirredução. São importantes em alimentos por provocarem alterações indesejadas de cor, aroma, sabor e valor nutricional.

Oxidoredutases são enzimas que realizam reações de oxirredução. Na ciência de alimentos, essas enzimas foram primeiramente conhecidas por sua capacidade de provocar alterações indesejadas, como mudanças de coloração, rancidez, perda de aroma e de valor nutritivo, especialmente em produtos de origem vegetal. O tratamento térmico denominado branqueamento — operação destinada à inativação térmica de enzimas — deve seu nome à sua aplicação para inativação de polifenol-oxidases com o objetivo de evitar o escurecimento enzimático (*browning*). Atualmente, no entanto, são conhecidos diversos usos e aplicações industriais que envolvem as oxidoredutases.

► Características gerais e modo de ação

As reações de oxirredução podem acontecer de diferentes formas, como estão esquematizadas na Figura 5.1.

Algumas oxidoredutases são capazes de catalisar apenas uma das formas de oxirredução apresentadas, enquanto outras, de acordo com o meio reacional, podem realizar diversos tipos de reação.

É comum, entre essas enzimas a ocorrência de desnaturação provocada pelo substrato ou pelo produto, principalmente quando a reação envolver a formação de radicais livres ou peróxidos, capazes de oxidar partes importantes da estrutura da proteína.

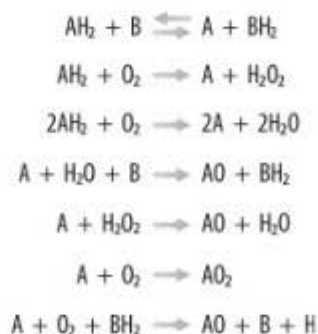


Figura 5.1 Reações catalisadas por oxidoredutases (Whitaker, 1994).

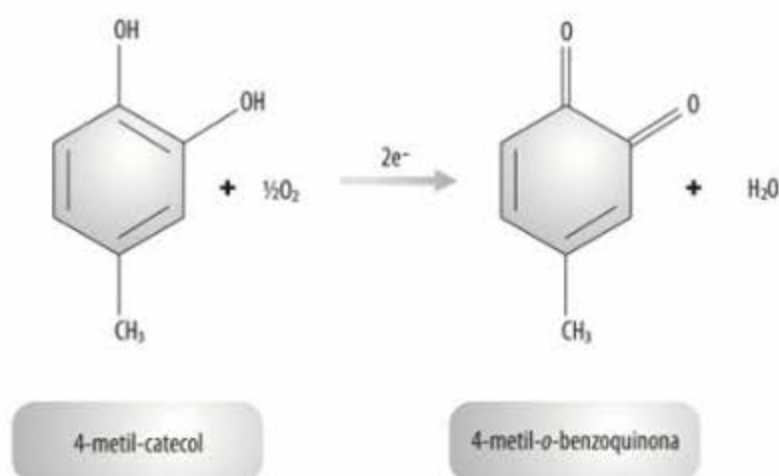


Figura 5.3 Ação da PFO sobre substrato do tipo *o*-difenol.

responsável pela fase *lag* da reação. A adição de difenóis ao meio reacional acelera a reação, reduzindo a fase *lag*. É comum que PFO de certas fontes (dependendo da espécie, variedade, tecido de extração, estágio de maturação etc.) não apresente atividade de cresolase.

► Fontes e principais características

Polifenol-oxidases são encontradas em grande parte dos seres vivos (animais, vegetais, bactérias e fungos). As de maior interesse para a ciência de alimentos são as de plantas (principalmente frutas e hortaliças), de fungos (cogumelos comestíveis) e de crustáceos (camarão, caranguejo e lagosta).

As PFO de maior interesse em alimentos são as de frutas e hortaliças, cogumelos comestíveis e crustáceos (camarão, caranguejo e lagosta).

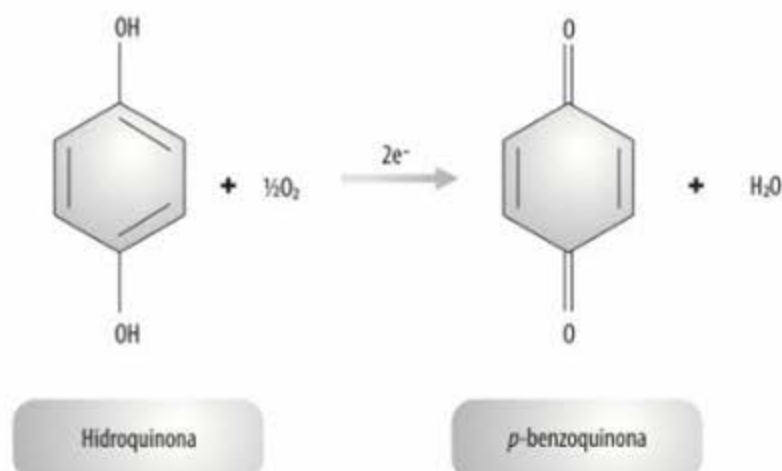


Figura 5.4 Ação da lacase sobre substrato do tipo *p*-difenol.

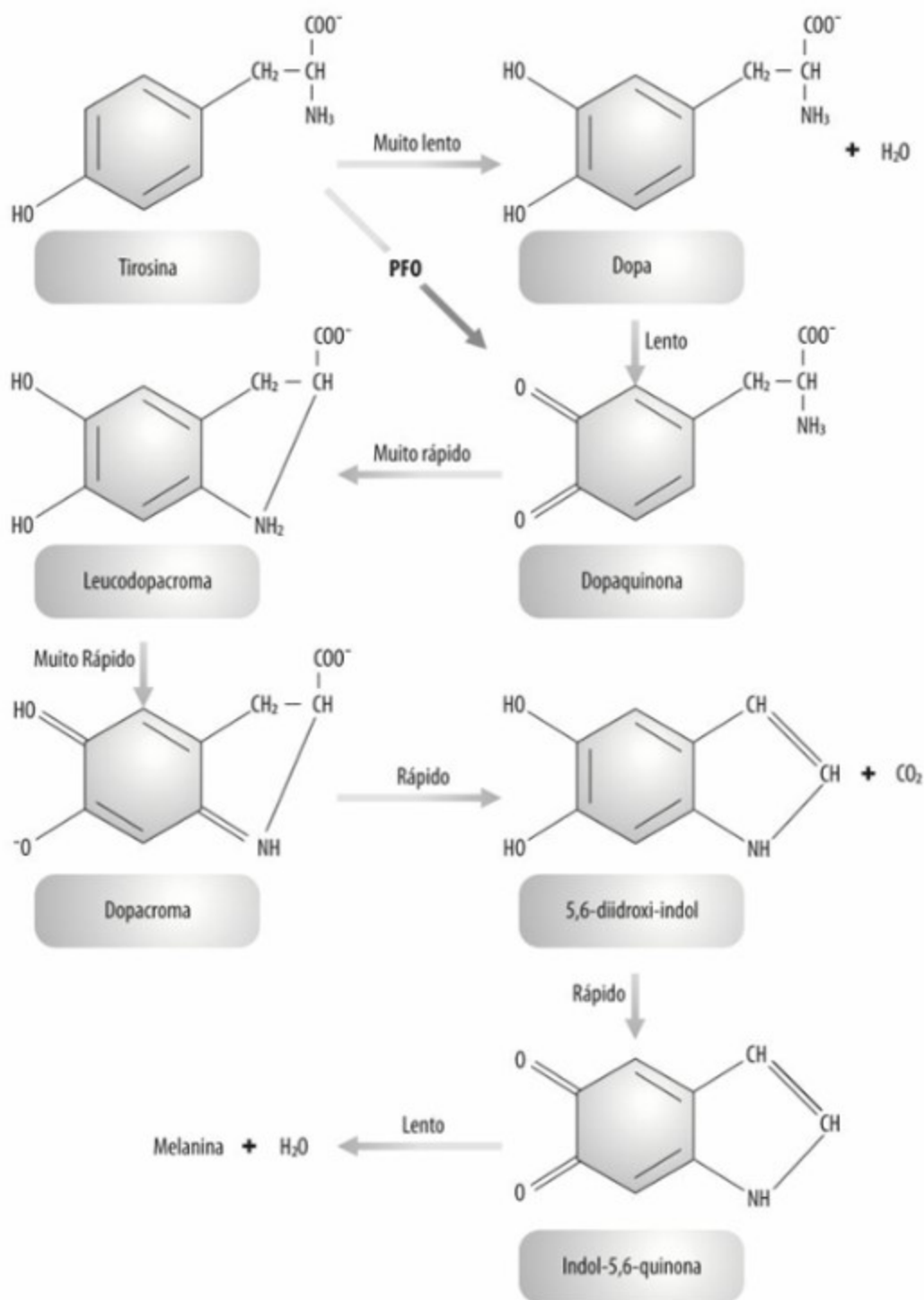


Figura 5.5 Mecanismo de formação de melaninas a partir de tirosina.

Na maior parte dos casos, PFO são enzimas ligadas a membranas e/ou confinadas em plastídeos. Em frutas e hortaliças, o teor de PFO solúvel aumenta com a maturação e a senescência. Essas enzimas existem nos tecidos vivos, em múltiplas formas geradas, provavelmente por

fenômenos de associação e dissociação entre diferentes unidades formadoras da enzima. Além disso, reações de polimerização com compostos fenólicos, de glicosilação e de proteólise limitada também interferem nas formas da PFO. Esses fenômenos dependem de diversos fatores do meio (pH, força iônica, concentração da enzima, presença de compostos interferentes etc.) e as formas enzimáticas produzidas podem diferir significativamente quanto a valores de pH ótimo de atuação, estabilidade térmica, especificidade de substratos, resposta a inibidores e efetores etc.

Em seu sítio (ou centro) ativo, a PFO contém, em geral, dois átomos de cobre, e a reação de oxidação envolve mudanças na valência do cobre e a retirada de elétrons de átomos do oxigênio.

A PFO é uma enzima de baixa especificidade, que age sobre uma grande variedade de compostos fenólicos. Entre os compostos naturais, os substratos mais importantes são as catequinas, ésteres do ácido cinâmico, 3,4-diidroxi-fenilalanina (dopamina) e a tirosina. Em geral, PFO apresentam alto K_m para seus substratos (inclusive O_2), dependendo de concentrações relativamente altas de substrato para mostrar atividade. PFO de diferentes fontes (vegetais e cogumelos) apresentam pH ótimo de atividade de 5,0 a 7,0. A maior parte delas é completamente inativada em valores de pH abaixo de 4,0. Essas enzimas apresentam baixa termoestabilidade e são inativadas por tratamento térmico relativamente brando, cuja eficiência aumenta com a redução do pH do meio.

As PFO agem sobre uma grande variedade de compostos fenólicos, apresentam baixa estabilidade térmica e são inativadas em valores de pH inferiores a 3,0–4,0.

Tabela 5.1 Possíveis substratos para PFO em diferentes vegetais.

Produto	Substrato
Banana	Dopamina
Batata	Tirosina, ácido clorogênico, flavonóides
Berinjela	Ácido cafêico, ácido cinâmico
Chá	Catequinas, taninos
Maçã	Ácido clorogênico, catequina

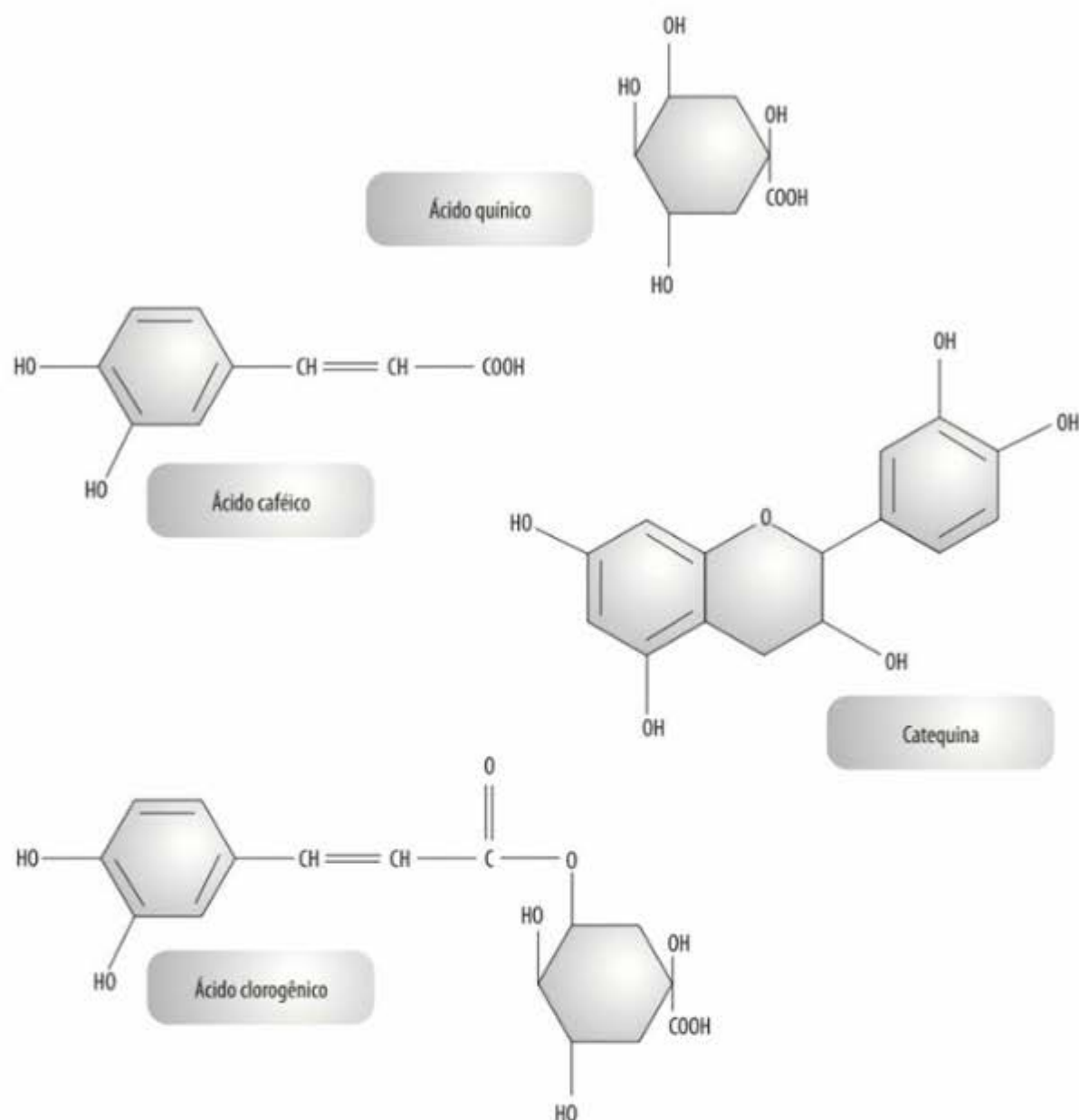


Figura 5.6 Estrutura química de alguns substratos naturais das PFO.

A função biológica das PFO ainda não foi totalmente esclarecida, mas algumas possibilidades já foram verificadas. A síntese de compostos fenólicos insolúveis, principalmente após lesão mecânica, ataque de insetos ou microrganismos, está relacionada aos mecanismos de defesa das plantas. Em alguns casos, as ações bacterios-tática e antiviral de melaninas e quinonas já foram comprovadas *in vitro* (em batatas). A PFO parece estar ainda relacionada à formação e ao desenvolvimento das raízes,

à síntese de lignina e a eventos ligados à fotossíntese e à respiração celular.

► Importância em alimentos: escurecimento enzimático

O principal efeito da PFO em alimentos é o escurecimento enzimático. Em alguns casos, esse fenômeno é totalmente indesejável por alterar o aspecto tradicional dos produtos, causando rejeição do consumidor. Além disso, as reações que formam pigmentos podem também ocasionar a formação de odores indesejáveis (*off flavors*) e a perda do valor nutricional, sobretudo por destruição de aminoácidos (tirosina e fenilalanina, p. ex.). Em virtude disso, vários métodos de prevenção do escurecimento enzimático foram desenvolvidos. Eles baseiam-se na inibição da enzima e na supressão de substratos e/ou retirada de produtos. Sua eficiência depende de diversos fatores, como produto (fonte das PFO), pH e temperatura. Alguns métodos de se evitar o escurecimento são discutidos a seguir.

Supressão do O_2

É alcançada pelo uso de embalagens a vácuo. Não é um método muito utilizado pois permite escurecimento do produto durante o processamento até o momento do acondicionamento e não garante a integridade do produto após ele ter sido aberto pelo consumidor.

Redução do pH (acidificação do produto)

Em geral, PFO são inativadas de modo irreversível em soluções com pH inferior a 3,0. A redução do pH deve ser feita o mais rapidamente possível após o descasamento.

Este método, embora bastante prático, apresenta algumas dificuldades, pois nem todos os produtos que sofrem escurecimento enzimático são compatíveis, em termos de sabor, com a acidez necessária para a inativação. Além disso, a difusão dos ácidos em pedaços grandes pode apresentar problemas de aplicação.

▼

O escurecimento acontece quando há o rompimento dos tecidos, que possibilita o encontro da enzima com seus substratos (fenólicos e O_2). Como resultado da ação enzimática, ocorrem alterações na cor, no aroma, no sabor e no valor nutritivo do alimento.

▼

O escurecimento pode ser controlado por supressão do O_2 , por acidificação do produto a valores de pH que inativem as PFO, por branqueamento que causa destruição térmica das PFO e pela adição de inibidores químicos.

Tratamento térmico (branqueamento)

A eficiência do tratamento depende muito do pH do meio. Quanto mais ácido, menores o tempo e a temperatura necessários para a inativação. Em geral, em valores de pH de 4,0 a 6,0, 3 min a 70 a 80°C são suficientes para a inativação.

Esse método apresenta duas desvantagens:

- pode gerar sabor de produto cozido em vegetais (é mais usado para produtos que sofrerão outros tratamentos posteriores — enlatados e desidratados);
- até que o aquecimento inative a enzima, ela continua catalisando a reação, o que pode gerar algum escurecimento, sendo este irreversível.

Adição de inibidores químicos

Sulfitos. Podem ser aplicados na forma de dióxido de enxofre que apresenta alta eficiência, devido à rápida penetração, porém é de difícil manuseio na planta industrial ou sob a forma de sais (metabissulfito ou bissulfito de sódio ou potássio). São de grande utilização na indústria de alimentos por apresentarem as seguintes vantagens:

- são inibidores diretos das PFO, atuando sobre seu sítio ativo;
- reagem com as quinonas formadas, gerando compostos incolores estáveis, o que evita que se polimerizem;
- são de baixo custo;
- apresentam atividade antimicrobiana.

O uso de altas dosagens, no entanto, pode provocar gosto e cheiro desagradáveis no produto, além de serem controlados pela legislação, por causarem crises alérgicas em pessoas asmáticas. Para possibilitar uma dosagem reduzida, são, em geral, usados em conjunto com ácidos.

Ácidos. São aplicados os ácidos cítrico, ascórbico e málico. Têm dupla função, pois abaixam o pH e inativam as

Sulfitos e ácido ascórbico evitam o escurecimento por destruição da enzima e por reagirem com as quinonas impedindo sua polimerização. Os ácidos cítrico e málico agem inativando o sítio ativo das PFO.

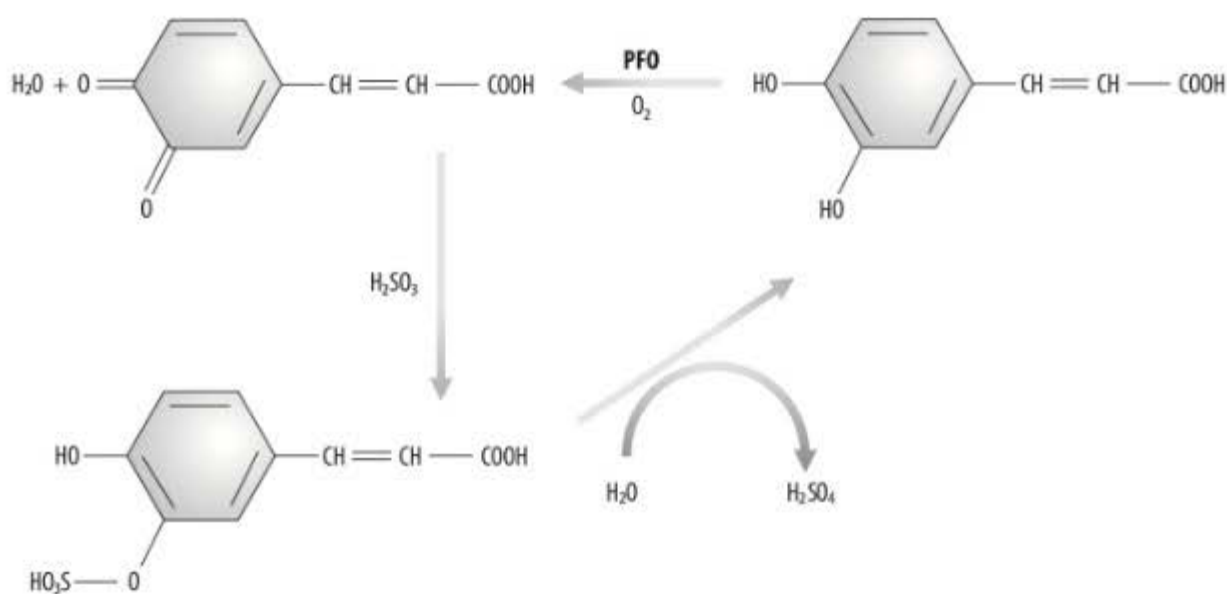


Figura 5.7 Ação dos sulfitos sobre a quinona.

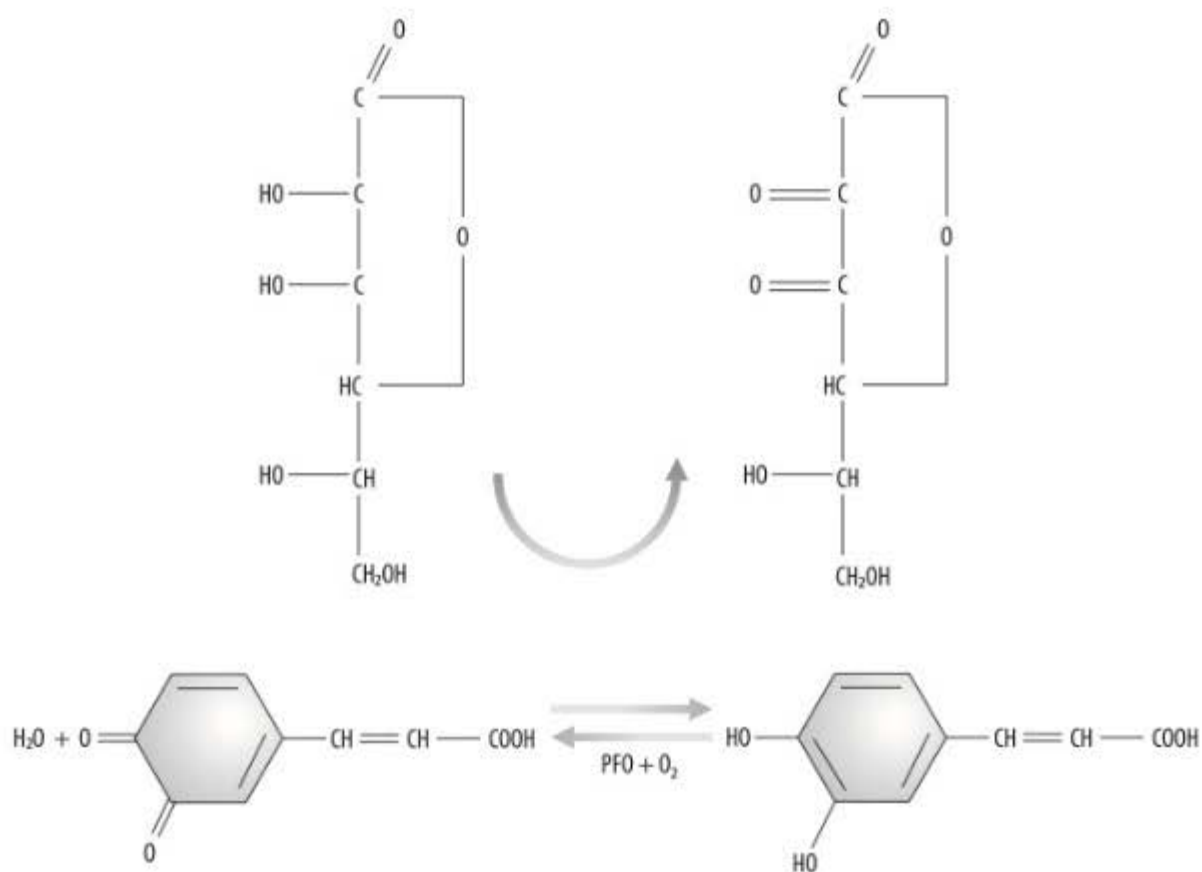


Figura 5.8 Oxidação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico com redução da quinona a difenol.

PFO, por ataque ao sítio ativo. O ácido ascórbico oxida os resíduos de histidina que ligam os íons de cobre do sítio ativo, enquanto os ácidos cítrico e málico são quelantes do cobre. O ácido ascórbico ainda apresenta a vantagem de reduzir as quinonas já formadas, de volta a o-difenóis. Porém tem alto custo e pode-se degradar, na forma oxidada, gerando escurecimento não-enzimático (cor amarelada indesejável).

Sais. A PFO pode ser inativada pela ação de halogenetos. Dentre esses, os de aplicação permitida em alimentos são, principalmente, os sais de cloro, sendo o NaCl o mais utilizado. No entanto, a inibição só é efetiva em concentrações relativamente elevadas do sal, o que limita sua aplicação devido ao sabor. $ZnCl_2$ e $CaCl_2$ são comercializados, em conjunto com ácido ascórbico, em um preparado comercial inibidor de excelente eficácia.

Agentes redutores. A cisteína e a N-acetil-cisteína, além da glutatona reduzida, são muito eficazes na remoção de quinonas do meio reacional, reagindo preferencialmente em relação à formação de melaninas e gerando compostos incolores e estáveis. Sua aplicação é, em geral, limitada pelo custo desses aditivos.

► Aplicação industrial

Em alguns casos, a ação da PFO é considerada benéfica e até mesmo indispensável para obtenção do produto desejado. É o caso da fabricação de chá preto. De grande consumo no mundo, o chá preto é obtido pela “fermentação” de folhas jovens e de botões florais da planta do chá. Embora o processo seja conhecido como fermentação, não há inóculo microbiano envolvido, apenas uma série de transformações bioquímicas que tornam preto o chá verde. A principal transformação leva à formação de flavinas e rubiginas, cujo teores estão diretamente ligados à qualidade do chá preto. No chá verde, o principal componente da fração fenólica são as catequinas. Durante a fermentação, as PFO da folha do chá agem sobre esses compostos, gerando quinonas, que sofrem

▼

A presença das PFO é indispensável à produção de chá preto, na obtenção de amêndoas de cacau de boa qualidade e na produção de frutas secas (ameixa e uva passa). Nesses casos, sua ação é responsável pela formação da coloração e do flavor característicos.

oxidação para gerar flavinas e flavina-galatos. Esses são pigmentos amarelos que se oxidam novamente para gerar rubiginas (de cor marrom-escura), responsáveis pela aparência final do produto. A determinação da atividade de PFO em diferentes plantas de chá mostra uma estreita correlação da ação da enzima com a obtenção de chá preto de alta qualidade.

A ação da PFO é ainda responsável pela formação da cor característica em amêndoas de cacau, durante sua fermentação, e em frutas secas, como ameixa e uva, durante o processo de evaporação da umidade. Alguns autores consideram ainda um certo escurecimento desejável em batatas a serem fritas.

► Peroxidases

PER são enzimas capazes de oxidar diferentes compostos (mono- e diidroxifenóis e compostos fenólicos complexos, preferencialmente) na presença de peróxidos, gerando radicais livres.

Peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas capazes de oxidar diferentes compostos, na presença de peróxidos, gerando radicais livres. Na ausência de peróxidos, essas enzimas podem ainda catalisar a oxidação de alguns substratos com auxílio de oxigênio molecular e também hidroxilar diferentes compostos aromáticos (tirosina, fenilalanina e outros fenólicos).

Por utilizarem uma grande quantidade de substratos e formarem produtos que sofrem subseqüentes reações (condensação e polimerização), os efeitos específicos da ação das peroxidases em organismos vivos são difíceis de serem identificados e podem ser confundidos com produtos de reação de outras enzimas (p. ex., PFO).

► Fontes e principais características

Peroxidases são enzimas existentes em células vegetais e animais e podem ser encontradas em diferentes microrganismos (como basidiomicetos degradadores de lignina — causadores da “podridão branca”). Para a ciência de alimentos, as de maior interesse são aquelas contidas em tecidos vegetais. Essas peroxidases encontram-se em paredes celulares, vacúolos e citoplasma e sua função biológica, embora não totalmente esclarecida, está rela-

As PER de maior importância em alimentos são as de origem vegetal: ferriprotoporfirina-peroxidases em sua maioria.

PER apresentam altas termoestabilidade e capacidade de regeneração após tratamento térmico. A determinação da vida de prateleira de produtos ricos em PER depende sempre da taxa de regeneração da enzima ao longo do tempo.

cionada à síntese de fito-hormônios (ácido indol-acético), à maturação e à senescência de frutos, à síntese de lignina por plantas e sua degradação por fungos e ainda a processos de lesão (mecânica e fisiológica) e de defesa contra infecções virais.

Existem dois tipos básicos de peroxidases: aquelas que contêm ferro no sítio ativo — que são divididas em ferriprotoporfirina-peroxidases e verde-peroxidases — e aquelas que contêm FAD no sítio ativo e são chamadas de flavoproteína-peroxidases. Dentre elas, as mais importantes são aquelas que contêm como grupo prostético a ferriprotoporfirina III (ou proto-hemina) e que incluem a maior parte das peroxidases de vegetais superiores. São, em geral, glicoproteínas e encontradas sob várias isoformas em cada espécie, normalmente provenientes de genes codificadores distintos.

A reação geral catalisada pelas peroxidases pode ser descrita como:



onde o composto ROOH é o substrato oxidante, tipicamente o peróxido de hidrogênio ($\text{R} = \text{H}$), mas podendo ser também um metil- ou etil-peróxido. Durante a reação, o peróxido reage com a enzima, formando o composto I oxidado que se reduz em duas etapas (passando pelo intermediário composto II), para regenerar a enzima. Há



Figura 5.9 Esquema cíclico da ação de peroxidases.

então a geração de radicais livres (dos substratos redutores, doadores de e^-).

Os mono- e os diidroxifenóis e os compostos fenólicos complexos, como os flavonóides, por exemplo, são substratos naturais das peroxidases.

A principal característica das peroxidases é sua termoestabilidade, associada a sua capacidade de se regenerar após desnaturação térmica. Essa capacidade, incomum entre as enzimas, é provavelmente devida à reincorporação do grupo prostético à apoenzima, após o tratamento térmico. A regeneração da atividade acontece em poucas horas em temperatura ambiente e em períodos mais longos de repouso sob refrigeração e congelamento. Sua eficiência está relacionada a dois fatores:

- grau de desnaturação alcançado durante o tratamento térmico — quanto mais eficiente for o branqueamento, mais lenta e menos eficiente é a regeneração;
- pH do meio — em geral, em meios ácidos, a desnaturação é mais eficiente e a renaturação mais lenta.

As peroxidases são capazes ainda de manter sua atividade em condições de muito baixas temperatura e atividade de água, como as encontradas em produtos congelados.

► Importância em alimentos

A atividade de peroxidases está intimamente ligada ao desaparecimento do aroma e ao surgimento de *off-flavors* em produtos vegetais, sobretudo naqueles conservados por congelamento. Além disso, essas enzimas podem participar da alteração da cor e da destruição do valor nutritivo desses produtos (oxidação de vitamina C e de aminoácidos). Por isso, é de extrema importância a aplicação de um tratamento térmico rigoroso antes do congelamento desses produtos.

Para uma eficiente inativação das peroxidases, em geral, é recomendada a aplicação de temperaturas de 90

As PER apresentam atividade em condições de baixa temperatura e baixa atividade de água, características de produtos congelados. As principais consequências de sua atividade são desaparecimento de aromas, surgimento de *off-flavors* e alterações de cor e valor nutritivo.

a 100°C. A presença de NaCl e o pH ácido auxiliam no processo, podendo reduzir o tempo de tratamento. Uma vez que essas enzimas são capazes de se regenerar, a determinação da vida de prateleira de produtos vegetais congelados está condicionada ao estudo da taxa dessa regeneração no produto e ao conseqüente surgimento dos efeitos relacionados à sua atividade.

► Aplicação industrial

Por apresentarem alta termorresistência, as peroxidases são usadas na indústria de alimentos como indicadores do processo de branqueamento, principalmente de produtos de origem vegetal. As peroxidases do leite (que são verdo-peroxidases) também são utilizadas como parâmetros de eficiência da pasteurização. A lactoperoxidase do leite cru, não causa grandes problemas de qualidade, pois não há peróxido de hidrogênio no meio. Ela é inativada a 82°C/20 s ou a 75°C/19 min. No entanto, uma vez que pode regenerar-se ao longo do tempo de armazenamento, mesmo sob refrigeração, esse tipo de teste deve ser realizado logo após o tratamento térmico. Em ambos os casos, aproveita-se a capacidade das peroxidases de formar compostos coloridos, que podem ser quantificados

Em virtude de sua alta termoestabilidade, as PER são utilizadas como indicadores da eficiência de tratamentos térmicos (branqueamento, pasteurização).

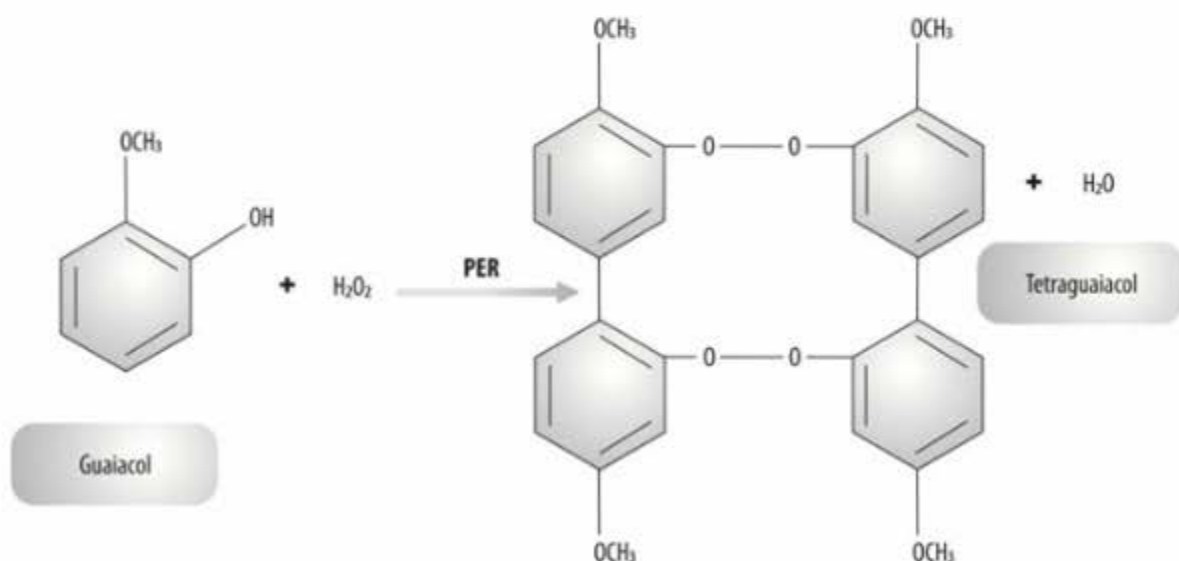


Figura 5.10 Ação da peroxidase sobre o substrato guaiacol. Formação de coloração vermelho-amarronzada (tetraguaiacol).

por colorimetria, na presença de diferentes compostos. Em geral se utiliza o guaiacol, que, após peroxidação gera o tetraguaiacol, um composto vermelho-escuro.

► Lipoxigenases

Lipoxigenases catalisam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, gerando hidroperóxidos na presença de O_2 . O produto da reação é instável e se degrada espontaneamente em compostos de menor massa molecular e aroma característico de ranço.

As lipoxigenases (EC 1.13.11.12) são também denominadas lipooxigenases, lipoxidases ou caroteno-oxidases. Essas enzimas possuem um átomo de ferro no centro ativo, que catalisa a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados contendo cis, cis-1,4-pentadieno para o seu conjugado correspondente cis, transdienônico mono-hidro-xiperóxido, na presença de oxigênio molecular. Os produtos da reação são instáveis e degradam-se, formando compostos de baixa massa molecular, em geral aldeídos e cetonas, responsáveis pelo aroma de ranço.

► Fontes e principais características

As lipoxigenases de maior interesse em alimentos são as produzidas por grãos (cereais e leguminosas). Nesses produtos e em seus derivados, as lipoxigenases podem ser responsáveis pelo fim da vida de prateleira.

São enzimas produzidas por plantas, animais e microrganismos em níveis muito variáveis, dependendo do tecido, da idade, de características genéticas, ambientais e de manejo. De maior interesse para a ciência de alimentos são as lipoxigenases de origem vegetal. São mais encontradas em grãos, sendo mais abundantes em leguminosas do que em gramíneas (cereais). Na maioria das vezes são encontradas isoenzimas, que podem diferir significativamente nas propriedades, tais como pH ótimo, especificidade do substrato, produto final, estabilidade térmica e capacidade para participar de reações de co-oxidação.

Existem dois principais grupos de lipoxigenases: as do tipo 1, características da soja e com atividade ótima em pH alcalino e as do tipo 2, de pH ótimo ácido.

Existem duas categorias principais de lipoxigenases: (1) lipoxigenases do tipo 1 (soja), encontradas em poucas plantas, têm pH ótimo de 9,0 e pouca tendência para participar de reações de co-oxidação; (2) lipoxigenases do tipo 2, que ocorrem em uma grande variedade de plantas, têm pH ótimo de 6,5 e uma grande tendência para participar de reações de co-oxidação.

A função biológica dessas enzimas não está muito clara. Sabe-se que sua atividade aumenta significativamente

durante os primeiros dias da germinação e há evidências de que as lipoxigenases estejam envolvidas na síntese do etileno (oxidação do ácido 1-aminopropano) e na síntese de xantonina, um inibidor do crescimento (a partir de violaxantina e ácido linoléico). Lipoxigenases animais estão envolvidas na síntese de compostos bioativos (lipoxinas e oxieicosanóides).

Em geral, lipoxigenases são específicas para lipídios que apresentam dupla insaturação, com um grupo metileno entre elas, localizado no carbono $\omega 8$ (cis, cis-1,4-pentadieno). É comum que as lipoxigenases de origem vegetal tenham maior afinidade pelos ácidos linoléico e linolênico, enquanto as de origem animal apresentam menor K_m para os ácidos araquidônico e eicosapentaenóico. A reação pode acontecer mais rapidamente sobre ácidos graxos esterificados (em triglicerídios ou metilados) ou livres, de acordo com a fonte da enzima.

A reação catalisada pelas lipoxigenases está ilustrada na Figura 5.11 e ocorre como descrito a seguir.

Inicialmente, a enzima deve ser ativada, passando de sua forma Fe^{2+} para a forma Fe^{3+} . Esta ativação é provo-

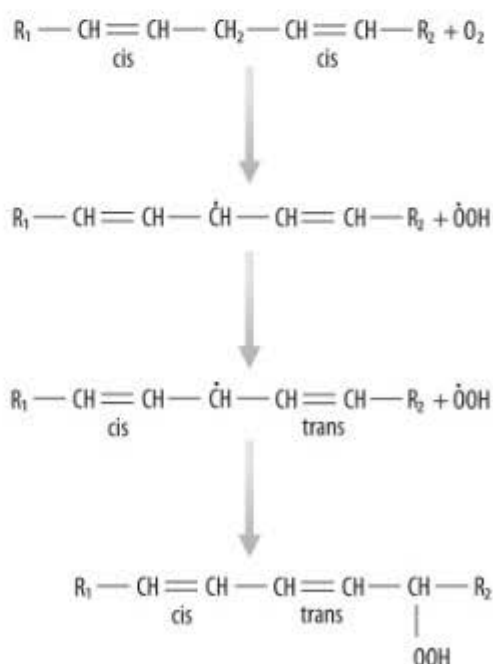


Figura 5.11 Formação de hidroperóxidos por lipoxigenase.

cada por hidroperóxidos de ácidos graxos já presentes no meio (formados por oxidação fotoquímica, p. ex.). A enzima ativada promove a retirada estereoquímica de 1 hidrogênio do carbono $\omega 8$, formando um radical. Em seguida, a enzima insere o O_2 na molécula, que se isomeriza, para formar o hidroperóxido final. Esse produto pode sofrer o ataque de diferentes enzimas (isomerasas, desidrogenases etc.) ou decomposição química, gerando aldeídos e cetonas cujo aroma é característico de rancidez.

Na ausência de O_2 , as lipoxigenases catalisam reações de peroxidação entre o radical formado no primeiro passo da reação e hidroperóxidos do meio.

► Importância em alimentos

Lipoxigenases são de grande interesse para a ciência de alimentos, principalmente por sua participação na gênese de *off-flavor* e compostos de aroma, além de sua influência na textura e nas propriedades nutritivas dos alimentos. A maioria dos vegetais contém os ácidos linoléico e linolênico, que são sujeitos à peroxidação lipídica pelas lipoxigenases. Essas enzimas podem produzir tanto compostos com aromas que são desejáveis como compostos responsáveis pelo *off-flavor*.

As lipoxigenases, principalmente em óleos vegetais (não refinados), em grãos (cereais e leguminosas) armazenados e em farinhas e farelos, podem causar rancidez, destruição de ácidos graxos essenciais, de pigmentos e de vitaminas. Em produtos de soja, a ação de lipoxigenases é responsável pela formação de *off-flavor* (também comum em milho e ervilha) e pelo surgimento de amargor (pela oxidação de fosfatidilcolina). Em ervilhas e feijão-verde, a ação dessas enzimas é responsável pela degradação da clorofila.

► Aplicação industrial

Em farinhas e em produtos de panificação, a adição de lipoxigenases é extremamente benéfica. Ela é feita

▼

Lipoxigenases causam o surgimento de rancidez e *off-flavor* em produtos vegetais, além de serem responsáveis pela destruição de pigmentos, vitaminas (clorofila, carotenóides) e ácidos graxos essenciais.

▼

Lipoxigenases podem ser aplicadas para branqueamento da farinha de trigo destinada ao consumidor final, pela destruição de seus carotenóides e também podem ser utilizadas em panificação, para aumento da força do glúten e melhora das características do pão. Em ambos os casos deve-se incorporar até 2% de farinha de soja à farinha de trigo utilizada.

pela incorporação de pequenas quantidades de farinha de soja à farinha de trigo. Em farinhas, as lipoxigenases são responsáveis pelo branqueamento por destruição dos carotenóides que dão cor indesejada ao produto. Essas enzimas também provocam o aumento de volume em pães, melhoram sua textura e retardam a sinérese. Acredita-se que a reação dos hidroperóxidos formados com os grupos sulfidril do glúten forme ligações cruzadas que melhoram as propriedades de glúten. Assim, as lipoxigenases aumentam também a resistência da massa ao trabalho excessivo e substituem, com sucesso, o uso de bromatos. Em massas alimentícias tipo macarrão as lipoxigenases não são benéficas. Nesses casos, a cor amarelada é um importante atributo de qualidade e deve ser protegida da ação de lipoxigenases nativas do trigo pelo tratamento térmico da farinha, antes da formulação (mistura com água).

► Catalases

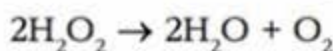
▼

Catalases são enzimas capazes de decompor o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. São utilizadas na remoção enzimática de glicose da clara de ovo (em conjunto com glicose-oxidases) e na remoção e detecção da adição de água oxigenada ao leite cru.

Uma das maiores descobertas a respeito da evolução da vida na Terra foi a habilidade dos organismos em utilizar o oxigênio molecular, possibilitando, pelos organismos aeróbicos, a extração de grande quantidade de energia dos alimentos. Entretanto essa vantagem teve o custo da produção de produtos tóxicos, conhecidos como espécies reativas do oxigênio; tais como peróxido de hidrogênio, radicais do ânion superóxido, oxigênio *singlet*, radicais hidroxilados e o óxido nítrico, o que poderia inviabilizar a vida desses organismos. Para poderem proteger-se dos efeitos destrutivos das espécies reativas do oxigênio, os organismos aeróbios produziram enzimas antioxidantes protetoras; tais como a catalase (EC 1.11.1.6), a superóxido-dismutase (EC 1.15.1.1) e a glutatona-peroxidase (EC 1.11.1.9), o que tornou possível o metabolismo celular oxidativo.

As catalases (EC 1.11.1.6) são enzimas produzidas pelos organismos aeróbios, desde bactérias até os seres humanos. São oxirredutases que catalisam a decompo-

sição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular e água, de acordo com a equação abaixo:



► Fontes e principais características

Catalases são enzimas tetraméricas que contêm quatro unidades de ferriprotoporfirina. São encontradas em células animais, vegetais e microbianas e, assim como outras oxirredutases, são encontradas em múltiplas isoformas em uma mesma espécie. Em organismos eucariotas, estão localizadas em peroxissomas e mitocôndrias, e sua principal função biológica é evitar o acúmulo de H_2O_2 proveniente de diferentes reações do metabolismo celular (oxidação de ácidos graxos e de glicolato, p. ex.). A Figura 5.12 ilustra a estrutura de três tipos diferentes de catalases.

► Aplicação industrial

Assim como na natureza, na indústria de alimentos as catalases são usadas para remover peróxido de hidrogênio:

- Na oxidação de glicose de clara de ovo, em conjunto com glicose-oxidases (discutido mais adiante neste capítulo);
- Na destruição de H_2O_2 intencionalmente adicionado ao leite e na detecção desse tipo de adulteração.

A existência de catalase em leite cru é um indicativo de leite de boa qualidade. Muitos produtores de leite adicionam água oxigenada a ele, para prevenir sua degradação, pelo efeito biocida da H_2O_2 . Dependendo da quantidade adicionada, a catalase nativa do leite é capaz de destruir todo o H_2O_2 adicionado, evitando que cause dano ao consumidor final. Entretanto a catalase tem a propriedade de ser inativada pelo substrato, isto é: quando em contato muito prolongado com o peróxido de hidrogênio, a enzima perde atividade. Se for muito grande a quantidade de água oxigenada adicionada, ina-

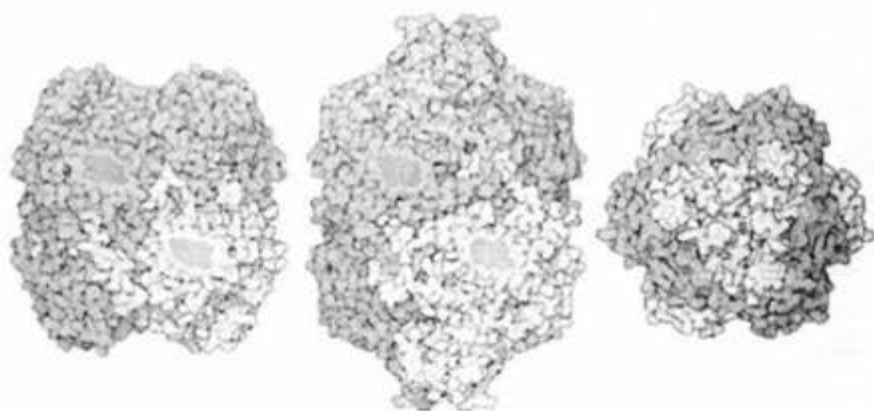


Figura 5.12 Estruturas de três diferentes tipos de catalases.

tizará toda catalase presente, deixando H_2O_2 residual, que torna o leite impróprio para o consumo. Para detectar a presença de catalase, os laticínios devem adicionar a uma amostra do leite cru algumas gotas de H_2O_2 . Caso a catalase esteja ativa, haverá borbulhamento, consequência da liberação de O_2 . Caso não se alcance esse efeito, é possível que o leite tenha sido adicionado de água oxigenada pelo produtor.

► Glicose-oxidases (EC 1.1.3.4)

Glicose-oxidases oxidam a glicose a ácido glicônico, gerando peróxido de hidrogênio. São flavoproteínas de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* aplicadas na remoção de glicose de produtos de ovos, de modo a evitar o escurecimento químico durante tratamento térmico. Encontram aplicação ainda na quantificação de glicose em análises clínicas e de alimentos, em conjunto com peroxidases.

As glicose-oxidases (EC 1.1.3.4) são oxirredutases que catalisam a oxidação de glicose a δ -D-gliconolactona, na presença de oxigênio molecular, gerando também peróxido de hidrogênio. Em meio aquoso, o produto da reação hidrolisa-se espontaneamente a ácido glicônico.

► Fontes e principais características

Glicose-oxidases são produzidas por algumas espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, entre outros, não sendo encontradas em animais e vegetais. Nestes organismos, acontece a formação de δ -D-gliconolactona, porém, na ausência de oxigênio e sem a formação de peróxido de hidrogênio, catalisada por diferentes enzimas.

As glicose-oxidases são flavoproteínas, cujo sítio ativo contém dois moles de flavina-adenina-dinucleotídeo

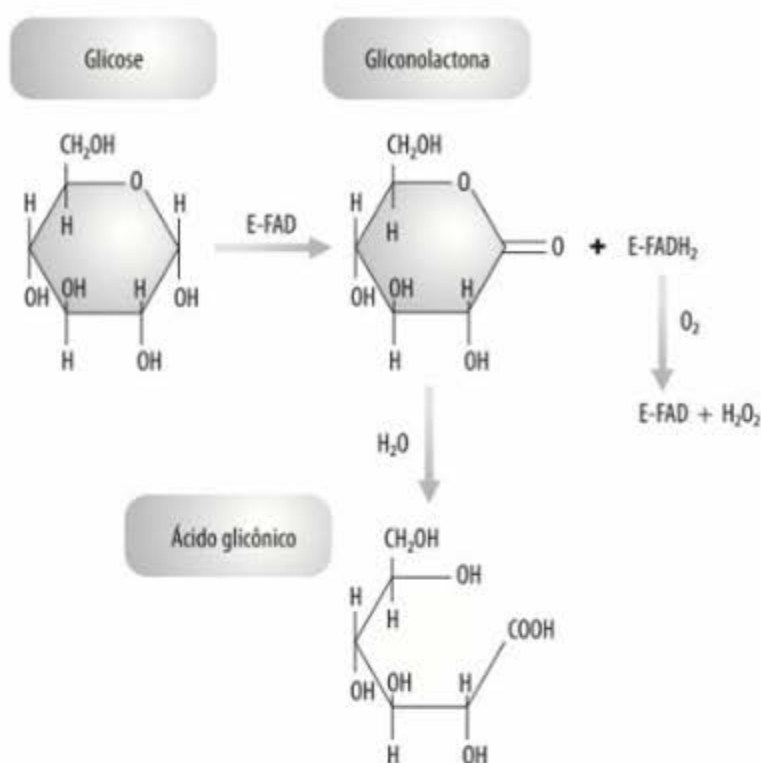


Figura 5.13 Formação de ácido glicônico pela ação da glicose-oxidase.

(FAD) por mol de enzima, e sua remoção provoca o desaparecimento total da atividade. Essa oxirredutase funciona como uma desidrogenase, transferindo dois moles de hidrogênio do Cl da glicose para cada mol de oxigênio molecular, por meio da redução/oxidação do FAD.

► Aplicação industrial

A principal aplicação das glicose-oxidases é a remoção de glicose da clara do ovo ou do ovo integral. Esses produtos sofrem escurecimento indesejado, causado pela reação de Maillard, quando submetidos a tratamentos térmicos, como pasteurização ou desidratação. O modo atualmente mais utilizado de se evitar o escurecimento é a transformação da glicose da clara em ácido glicônico, pelo uso de glicose-oxidases. Para a remoção do peróxido de hidrogênio formado, é conveniente a aplicação conjunta de catalases, que ainda fornecem o oxigênio necessário à primeira reação. Para acelerar o processo, é indicada a adição de pequenas quantidades de H_2O_2 ao meio. Esse processo evita a reação de escurecimento, por

supressão de um dos reagentes (glicose) e evita perdas significativas de sólidos da matéria-prima, o que garante o rendimento do produto desidratado.

Glicose-oxidases são ainda utilizadas, em grandes quantidades, em análises clínicas, de alimentos e de fármacos, em conjunto com peroxidases, na detecção e na quantificação de glicose (em amostras de sangue, p. ex.). As reações envolvidas estão ilustradas na Figura 5.14.

A glicose-oxidase oxida a glicose da amostra, liberando H_2O_2 , que é utilizado pela peroxidase, formando tetraguaiacol, que poderá ser quantificado colorimetricamente. Desse modo, pela quantidade de tetraguaiacol formado, é possível determinar a quantidade de glicose da amostra.

► Xantina-oxidases

Xantina-oxidases oxidam hipoxantina, xantina, além de purinas e pteridinas, com auxílio de O_2 e formação de H_2O_2 . Em meio ácido, as xantina-oxidases formam superóxidos altamente reativos. Estão associadas à ativação de lactoperoxidases no leite e à degradação oxidativa desse produto.

As xantina-oxidases (EC 1.1.3.22) são oxirredutases que catalisam a oxidação da hipoxantina para xantina e da xantina para ácido úrico. Elas também catalisam a oxidação de uma grande variedade de purinas, aldeídos e pteridinas. A oxidação dos substratos ocorre com a concomitante redução de O_2 para H_2O_2 . Quando o pH e a concentração de O_2 são altos e a concentração de xantina é baixa, forma-se a espécie reativa superóxido (O_2^-).

► Fontes e principais características

São enzimas diméricas (metalo-flavoproteína) com massa molecular aproximada de 300.000Da. O centro ativo contém molibdênio, flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), ferro e enxofre na proporção de 1:1:1:4. A acidifi-

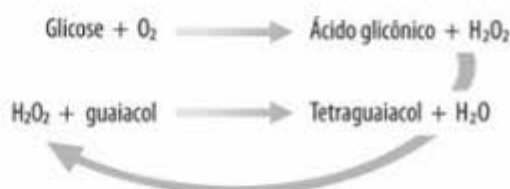


Figura 5.14 Esquema de reações para a quantificação de glicose pelo método enzimático.

cação ou o aquecimento a 100°C, em pH 7, rapidamente libera enxofre na forma de H_2S . Essa enzima também contém um mol de fósforo covalentemente ligado ao centro ativo.

Leite bovino é uma fonte muito rica de xantina-oxidase, contendo aproximadamente 35 mg/l. Essa enzima também existe em leite caprino e até no leite humano. A xantina-oxidase apresenta-se distribuída entre a fase do creme e a do soro.

► Importância em alimentos

A atividade da xantina-oxidase está associada à deterioração oxidativa do leite e de produtos lácteos, via produção de superóxido (O_2^-). Há também evidências de que, no leite, essa enzima e as purinas possam gerar H_2O_2 para a lactoperoxidase, apresentando assim ação bactericida ou bacteriostática.

► Ascorbato-oxidases

Ascorbato-oxidases oxidam o ácido ascórbico, destruindo sua atividade como vitamina C. O produto oxidado (ácido desidroascórbico) sofre escurecimento químico, provocando perda de qualidade em diversos produtos: sucos cítricos, espécies do gênero *Cucumis*, sementes e grãos.

Ascorbato-oxidases (EC 1.10.3.3) são enzimas que contêm cobre no sítio ativo e que catalisam a oxidação da vitamina C (ácido ascórbico). Entretanto, vale lembrar que a oxidação do ácido ascórbico também pode ocorrer na ausência dessas enzimas, com formação de ácido desidroascórbico e peróxido de hidrogênio. Essa reação é catalisada por íons cobre, e o peróxido de hidrogênio formado causa destruição do ácido ascórbico.

► Fontes e principais características

Ascorbato-oxidases ocorrem em todas as espécies do gênero *Cucumis* (pepino, melão, maxixe etc.), em sementes, grãos e em algumas frutas; como, por exemplo, as cítricas. A Figura 5.15 ilustra os compostos formados durante a oxidação do ácido ascórbico pela ascorbato-oxidase.

► Importância em alimentos

A ascorbato-oxidase apresenta uma grande importância em frutas e produtos de origem vegetal; como, por

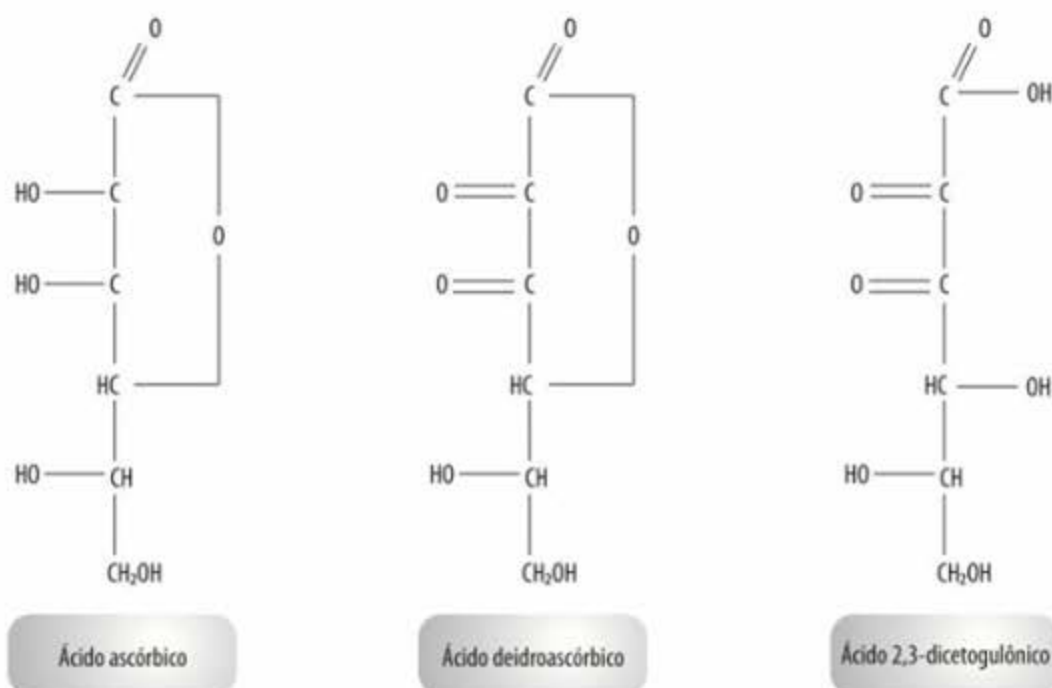


Figura 5.15 Compostos formados na oxidação do ácido ascórbico pela ascorbato-oxidase.

exemplo, em sucos de frutas cítricas. Na fruta intacta, as oxidases e as redutases estão balanceadas, de modo que a interação desses dois sistemas enzimáticos determina o nível final de ácido ascórbico. No entanto, durante a extração de sucos, as redutases sofrem grandes danos, o que deixa as oxidases livres para destruírem o ácido ascórbico. Esse processo é responsável pela iniciação do escurecimento não-enzimático e pela perda da atividade da vitamina C durante o armazenamento. Essas reações podem ser minimizadas pela exclusão do oxigênio molecular ou pelo tratamento prévio de branqueamento para inativação enzimática.

► Métodos de detecção da atividade

► Polifenol-oxidases

A determinação de sua atividade não é muito simples, uma vez que os produtos de reação (quinonas) sofrem modificações químicas que dificultam sua quantificação. Além disso, outras enzimas (peroxidases e lacases), também presentes nas fontes de PFO, interferem na leitura

dos resultados. Nesses casos, podem ser adicionados ao meio inibidores seletivos capazes de diferenciar as PFO de outras oxirredutases contaminantes.

Para ensaio da atividade de monofenolase, os substratos mais aplicados são *p*-cresol, tirosina e o ácido *p*-cumárico. Para determinação da atividade de difenolase, os principais substratos usados são o catecol e o metilcatecol. A detecção pode ser feita por espectrofotometria (detecção do surgimento da cor) ou, em reatores fechados, pelo consumo de O_2 (uso de sensores específicos — eletrodos). O método mais acurado de se fazer essa determinação é pelo uso de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) para separação do produto de reação e sua quantificação por curvas de calibração. Nesse método, o meio deve conter agentes redutores que impeçam a polimerização das quinonas. Essa metodologia apresenta a desvantagem de ser bastante demorada e cara.

► Peroxidases

Essas enzimas geram produtos coloridos, mensuráveis quantitativamente via espectrometria de luz visível, com uma grande variedade de substratos, na presença de H_2O_2 . Dentre eles, o substrato mais usado é o guaiacol, uma vez que o procedimento é bastante simples e os parâmetros de reação são bem conhecidos.

O meio reacional é composto de guaiacol e H_2O_2 , e a reação inicia-se pela adição da enzima. A formação de cor é acompanhada por absorbância a 470nm e é proporcional à atividade da enzima, em função do tempo.

► Lipoxigenases

O substrato-padrão para medida de atividade dessas enzimas é o ácido linolênico. A formação do produto pode ser acompanhada como segue de diversas formas, a saber:

- em reatores fechados, pode ser determinado o consumo de O_2 , pelo uso de eletrodos específicos;

- o surgimento de duplas conjugadas, primeira etapa da reação, pode ser medido por absorbância a 232,5nm;
- a formação de hidroperóxidos pode ser quantificada por método titulométrico, tendo-se como titulante iodo (I_2) em meio saturado de iodeto de potássio (KI). Esse método apresenta a desvantagem de não ser contínuo, isto é: a reação deve ser paralisada e seu produto quantificado depois;
- é possível estimar-se a atividade de lipoxigenase pela destruição de carotenos (desaparecimento da cor) em meio reacional que contém ácido linolênico e O_2 , espectrofotometricamente. No entanto o resultado não é linear em relação à atividade da enzima. Serve como determinação qualitativa.

► Catalases

Sua atividade pode ser quantificada pelo desaparecimento do substrato — destruição de H_2O_2 (leitura em espectrofotômetro a 235nm), pelo surgimento do produto — formação de O_2 (eletrodos específicos) ou pela quantificação de substrato residual, após tempo determinado de reação — titulação de H_2O_2 remanescente no meio (uso de permanganato de potássio em meio ácido).

► Glicose-oxidase

Em reatores fechados, pode-se determinar o consumo de O_2 pelo uso de eletrodos. Há ainda a possibilidade de se quantificar a formação de H_2O_2 pelos métodos espectrofotométrico ou titulométrico acima mencionados ou, ainda, pelo uso conjugado de peroxidases, na presença de guaiacol.

► Bibliografia

- Araújo, J.M.A. *Escurecimento enzimático*. In: Química de Alimentos — Teoria e prática, 287-306. Ed. UFV, Viçosa. 2004.
- Eskin, N.A.M. *Biochemistry of Foods*. In: Oxidoreductases, 504-509. Academic Press, Inc., Londres. 1990.

- Feeney, R.E.; Osuga, D.T. *Biollogically Active Proteins in Eggs*. In: Fox, P.F. Food Enzymology, Vol. II, 256-286. Elsevier, Londres. 1991.
- Fennema, O.R. *Food Chemistry*. In: Richardson, T & Hyslop, D.B. Enzymes, 371-476. Marcel Dekker, Nova York. 1985.
- Robinson, D.S. *Peroxidases and Catalases in Foods*. In: Robinson, D.S.; Eskin, N.A. M. Oxidative Enzymes in Foods, 11-47. Elsevier, Londres. 1995.
- Scott, D. *Applications of Glucose Oxidase*. In: Reed, G. Enzymes in Food Processing, 519-548. Academic Press, Nova York. 1975.
- Scott, D. *Oxidoreductases*. In: Reed, G. Enzymes in Food Processing, 222-254. Academic Press, Nova York. 1975.
- Veisseyre, R. *Lactología Técnica* (Technologie du Lait). Acribia, Zaragoza. 1988.
- Whitaker, J.R. *Catalase and Peroxidase*. In: Principles of Enzymology for the Food Sciences, 565-579. Marcel Dekker, Nova York. 1994.
- Whitaker, J.R. *Glucose Oxidase*. In: Principles of Enzymology for the Food Sciences, 533-541. Marcel Dekker, Nova York. 1994.
- Whitaker, J.R. *Lipoxigenase*. In: Principles of Enzymology for the Food Sciences, 579-594. Marcel Dekker, Nova York. 1994.
- Whitaker, J.R. *Lipoxigenase*. In: Robinson, D.S.; Eskin, N.A.M. Oxidative Enzymes in Foods, 175-215. Elsevier, Londres. 1995.
- Whitaker, J.R. *Polyphenol Oxidase*. In: Principles of Enzymology for the Food Sciences, 543-556. Marcel Dekker, Nova York. 1994.
- Zawistowski, J.; Biliaderis, C.G.; Eskin, N.A.M. *Polyphenol oxidase*. In: Robinson, D.S.; Eskin, N.A.M. Oxidative Enzymes in Foods, 217-271. Elsevier, Londres. 1995.

6

Transformações Bioquímicas em Produtos Hortícolas após a Colheita



Angelo Pedro Jacomino

Maria Cecília de Arruda

Ilana Urbano Bron

Ricardo Alfredo Kluge

- Introdução, 154
- Amadurecimento de produtos hortícolas: fatores de influência, 155
- Amadurecimento de produtos hortícolas: mudanças bioquímicas, 169
- Frutas e hortaliças minimamente processadas, 183
- Bibliografia, 187

► Introdução

Os produtos hortícolas são compostos por uma grande variedade de vegetais de importância econômica na dieta alimentar da população de todo o mundo que é também utilizada como ornamentação. São comumente chamados de frutas, hortaliças e flores.

A crescente busca por uma alimentação mais saudável, aliada ao desejo de satisfação do consumidor, tem levado à geração de um comércio cada vez maior de produtos hortícolas, tanto dentro de cada país, quanto entre países dos diferentes continentes. Esse comércio, especialmente o de exportação, é altamente competitivo e requer profissionalismo. O profissional da área de pós-colheita necessita, cada vez mais, conhecer as técnicas de conservação e as necessidades de cada vegetal para proporcionar a máxima conservação de suas características, uma vez que as exigências dos vegetais são distintas e é impossível padronizar procedimentos.

Os produtos hortícolas originam-se de diferentes estruturas anatômicas dos vegetais e têm comportamentos distintos após a colheita. Estão listadas, a seguir, algumas partes dos vegetais mais utilizadas como produtos hortícolas de importância comercial e algumas de suas características.

Folhas. Os produtos mais comuns são as hortaliças de folhas. São estruturas muito sensíveis à perda de água, devido à elevada relação entre a superfície e o volume. Geralmente, são sensíveis também à perda da cor verde.

Flores. Os exemplos mais comuns são as hortaliças de flores, tais como brócolis e alcachofras, além das flores, propriamente ditas, utilizadas na ornamentação. A flor é uma etapa efêmera na fenologia da planta e, conseqüentemente, a sua vida útil, como produto comercial é muito curta. As flores apresentam rápida senescência e geralmente são muito sensíveis ao etileno.

Raízes, bulbos e tubérculos. São estruturas de reserva das plantas e, portanto, apresentam baixa taxa metabólica e

Os produtos hortícolas originam-se de diferentes estruturas vegetais, e é preciso conhecer as necessidades de cada produto para garantir máxima conservação. Frutos formam o grupo de maior importância comercial e são usados como modelos para as transformações bioquímicas após a colheita.

poucas transformações após a colheita. Alguns permitem conservação por períodos bastante longos. Os principais problemas de conservação após a colheita estão relacionados à ocorrência de podridões e ao brotamento.

Brotações. Alguns produtos hortícolas de importância comercial são brotações, como o aspargo, por exemplo. Apresentam taxa metabólica muito alta e curto período de conservação após a colheita.

Frutos. Compõem uma grande variedade de produtos de importância comercial. Podem ser classificados de diversos modos. Alguns frutos estão inseridos na classe das hortaliças. São as hortaliças de fruto, tais como tomate, pepino e berinjela. Outros são classificados como frutas. São geralmente consumidas em sobremesas, como sucos ou no café-da-manhã. Diferenciam-se do grupo anterior principalmente pelos sabores doce e ácido. Nesse grupo, incluem-se, entre outros, frutas cítricas, banana, manga e mamão.

Os frutos sofrem grandes alterações em sua composição durante o amadurecimento, sejam ligados à planta-mãe ou não. Além disso, representam o grupo de produtos hortícolas de maior importância comercial. Portanto, eles serão utilizados, neste capítulo, como modelos para ilustrar as transformações bioquímicas após a colheita.

► Amadurecimento de produtos hortícolas: fatores de influência

▼

O amadurecimento corresponde às mudanças nos atributos sensoriais que tornam o fruto aceitável para consumo e envolve reações de degradação e síntese.

O amadurecimento corresponde às mudanças sensoriais de sabor, odor, cor e textura, que tornam o fruto aceitável para o consumo. Basicamente, os frutos são compostos de água, ácidos, compostos voláteis, carboidratos, pigmentos, vitaminas e minerais. Todos esses compostos podem sofrer algum tipo de alteração durante o amadurecimento. As transformações que ocorrem durante o amadurecimento envolvem processos de degradação e síntese. O conhecimento dessas mudanças metabólicas associadas ao amadurecimento é essencial

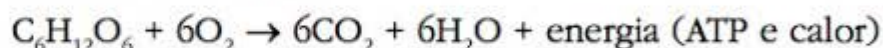
para se aplicarem técnicas que visem à conservação da qualidade dos frutos.

► Respiração

Durante o desenvolvimento do fruto, ocorre a translocação de solutos da planta-mãe para o fruto, o que é chamado de relação fonte-dreno. Após a colheita, essa relação não existe mais e o fruto consome suas próprias reservas para manter o seu metabolismo, já que é um produto vivo e, portanto, continua a realizar todos os processos biológicos essenciais à vida. A respiração é o principal processo fisiológico dos produtos hortícolas após a colheita. É por meio desse processo que o fruto obtém energia para manutenção de seu metabolismo, além disso muitos compostos intermediários da respiração são necessários para se executarem diversas reações de síntese.

Conceito

A respiração pode ser definida como a degradação oxidativa de substâncias complexas (amido, açúcares, lipídios, proteínas, ácidos) em moléculas mais simples (CO_2 e H_2O), com produção de energia e geração de moléculas usadas em reações de síntese. Pode ser resumida na seguinte equação:



Etapas da respiração

A respiração ocorre em três etapas: *glicólise*, *ciclo de Krebs* e *cadeia transportadora de elétrons*.

Glicólise. É um processo anaeróbico que ocorre no citosol, no qual uma molécula de glicose (composta por seis carbonos) é quebrada em duas moléculas de piruvato (compostas por três carbonos). A molécula de glicose tem 686kcal, enquanto as duas de piruvato possuem 546kcal, ou seja, a maioria da energia da glicose ainda permanece nas duas moléculas de piruvato.

▼
A respiração é o principal processo fisiológico após a colheita e consiste na oxidação de moléculas complexas, que geram energia, e moléculas mais simples. Quanto mais elevada a atividade respiratória de um fruto, mais perecível ele será.

▼
No citosol, a glicólise, a via das pentoses-fosfato e a via do ácido chiquímico são responsáveis pela geração de importantes metabólitos para produção de compostos de aroma, pigmentos e hormônios, entre outros. Em anaerobiose, a célula passa a realizar fermentação alcoólica com acúmulo de acetaldeído e etanol.

A enzima mais importante dessa fase é a fosfofrutoquinase que catalisa a reação de conversão de frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato. Altas concentrações de CO_2 reduzem a atividade dessa enzima.

Na glicólise, são consumidos dois ATP, produzidos quatro ATP e dois NADH.

O piruvato, em condições aeróbicas, é oxidado e descarboxilado a acetil-CoA pela enzima piruvato-desidrogenase. Nessa etapa, forma-se um NADH. A atividade dessa enzima é reduzida por altas concentrações de CO_2 e baixas de O_2 . O acetil-CoA é um composto essencial para síntese de compostos aromáticos e, por esse motivo, altas concentrações de CO_2 e baixas de O_2 podem impedir a formação de compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos frutos.

Ciclo de Krebs. Ocorre na matriz mitocondrial e é caracterizado por oito etapas, sendo cada etapa catalisada por uma enzima específica. Primeiramente, o acetil-CoA complexa-se com o oxalacetato (composto por quatro carbonos), formando o citrato (seis carbonos). Ao longo do ciclo, dois dos seis carbonos são oxidados e, desse modo o oxalacetato é regenerado. Uma das principais enzimas do ciclo é a succinato-desidrogenase que converte succinato em fumarato. Em altas concentrações de CO_2 , a atividade dessa enzima é reduzida e o acúmulo de succinato pode ser tóxico às células.

No decorrer do ciclo de Krebs parte da energia liberada pela oxidação dos átomos de carbono é usada para converter ADP em ATP (uma molécula por ciclo), mas a maior parte é usada para reduzir o NAD (três moléculas por ciclo). Além disso, parte da energia é utilizada para reduzir um segundo transportador de elétrons, a ubiquinona (uma molécula por ciclo).

Em condições de anaerobiose, o piruvato é descarboxilado à acetaldeído pela piruvato-descarboxilase e, depois, a etanol pela álcool-desidrogenase. Nesse caso, alterações no sabor e aroma de frutos e hortaliças podem ocorrer.

Cadeia transportadora de elétrons. A maior parte da energia de oxidação fica nos elétrons que foram removidos dos carbonos quando esses foram oxidados. Na cadeia transportadora de elétrons, os elétrons dos transportadores são transferidos através de vários compostos intermediários até o nível energético mais baixo do O_2 . Quando os elétrons fluem ao longo da cadeia de transporte de elétrons, dos níveis mais altos para os mais baixos de energia, a energia liberada é usada pelos complexos protéicos para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. Posteriormente, alguns prótons retornam à matriz e liberam energia, que é utilizada por um complexo enzimático ATP-sintase para produção de ATP.

Cada vez que um par de elétrons passa do NADH para o O_2 , prótons suficientes são bombeados através da membrana para gerar três moléculas de ATP.

Cada vez que um par de elétrons passa da ubiquinona para o O_2 , prótons suficientes são bombeados através da membrana para gerar duas moléculas de ATP.

Os NAD reduzidos durante a glicólise, que ocorre no citosol, precisam ser transportados através da membrana mitocondrial para serem oxidados na cadeia de transporte de elétrons, o que envolve um custo de uma molécula de ATP por NAD.

Durante todo o processo de respiração são produzidos 36 moles de ATP por mol de glicose.

A glicólise não é a única rota disponível para a oxidação da glicose no citosol de células vegetais. A via oxidativa das pentoses-fosfato, que ocorre paralelamente à glicólise, também pode executar essa função. Esta via é muito importante na fase pré-climatérica, pois é nela que a metionina, precursor primário do etileno, é formada. Durante essa via, também são formadas uma série de trioses, pentoses e hexoses. Dentre essas, estão a eritrose 4P e a ribose 5P. A ribose 5P é necessária à síntese de precursores de RNA e DNA. A eritrose 4P, juntamente

com o fosfoenol-piruvato, produzido na glicólise, forma a via do ácido chiquímico, uma via do metabolismo secundário. Essa via é responsável pela produção de aminoácidos aromáticos: tirosina, triptofano e fenilalanina. A fenilalanina é precursora de compostos fenólicos, como a lignina e os flavonóides. Dentre os flavonóides, destacam-se antocianinas, cumarinas e isoflavonas.

Padrões de atividade respiratória

De modo bastante generalizado, os frutos podem ser divididos em duas classes de acordo com o padrão de atividade respiratória:

Frutos climatéricos. São aqueles cujo amadurecimento é acompanhado por um distinto aumento na atividade respiratória, que é geralmente associado a elevadas produções de etileno (Figura 6.1). O menor valor observado na atividade respiratória é chamado de “mínimo pré-climatérico”. O pico respiratório, designado “máximo climatérico”, é seguido por um declínio na atividade respiratória chamado de “pós-climatérico”. O climatérico pode ser definido como a fase do desenvolvimento em que ocorre elevação da atividade respiratória, associada a uma produção autocatalítica de etileno e a inúmeras transformações bioquímicas. Geralmente, frutos climatéricos são colhidos na maturidade fisiológica, ainda verdes, para facilitar o manuseio e ampliar o tempo de conservação. Nesse caso, o processo de amadurecimento ocorre com o fruto separado da planta-mãe; são exemplos de frutos climatéricos: abacate, banana, mamão, pêra e maracujá.

Frutos não-climatéricos. São aqueles que não apresentam aumentos na atividade respiratória e na produção de etileno. A respiração desses frutos geralmente apresenta decréscimo gradual durante o amadurecimento (Figura 6.1). Em frutos não-climatéricos, as mudanças ligadas ao amadurecimento ocorrem de forma lenta e gradativa, enquanto esses frutos estão ligados à planta; devem ser colhidos na maturidade horticultural, ou seja, quando apresentarem características ótimas para o consumo.

Os frutos são divididos em climatéricos e não-climatéricos de acordo com seu padrão respiratório.

Os climatéricos apresentam grandes variações na respiração ao longo da vida, coincidindo o amadurecimento com a fase de maior atividade respiratória. Podem ser colhidos ainda verdes – completam seu amadurecimento longe da planta-mãe. Os não-climatéricos não apresentam aumentos na atividade respiratória e deverão ser colhidos quando apresentarem as características ótimas para consumo.

Alguns exemplos de frutos não-climatéricos são: limão, laranja, morango, uva e figo.

A atividade respiratória tem estreita relação com o tempo que o produto leva para amadurecer e, conseqüentemente, com a vida pós-colheita do produto; assim, frutos com taxas elevadas, geralmente são mais perecíveis.

A classificação dos frutos em climatéricos e não-climatéricos, baseada em seu comportamento respiratório, está sendo considerada uma visão muito simplificada do comportamento pós-colheita dos frutos, no qual as particularidades de cada espécie deveriam ser mais bem estudadas.

Fatores que afetam a respiração

Etileno. É o único hormônio gasoso conhecido. É um hidrocarboneto (C_2H_4), ativo em concentrações muito baixas (cerca de 0,1 ppm), e considerado o hormônio do amadurecimento, embora outros hormônios também estejam envolvidos nesse processo, como a citocinina e o ácido abscísico. No início do amadurecimento, observa-se redução nos níveis de citocinina e aumento nos níveis de ácido abscísico.

O etileno está também relacionado à resposta do vegetal a estresses.

A produção de etileno varia nos frutos climatéricos e nos não-climatéricos. Todo fruto produz etileno, o que varia é a concentração. Em climatéricos, a concentração é bastante variável durante o desenvolvimento, apresentando produção máxima no amadurecimento. Antes do início do amadurecimento, os frutos produzem quantidades baixas de etileno (sistema 1); com o início do climatério, há um aumento na produção do etileno, que se torna autocatalítica (sistema 2), com quantidades maiores do hormônio evidenciadas pela alta atividade da ACC-sintase (Figura 6.2). Nos frutos climatéricos, o ciclo de regeneração da metionina (ciclo de Yang) assim como a reciclagem do ACC são mais pronunciados

▼

O etileno é o hormônio do amadurecimento e também está ligado à resposta do vegetal ao estresse. Em frutos climatéricos sua síntese é autocatalítica. O acúmulo de etileno pode acelerar demasiadamente o amadurecimento dos frutos, antecipando a senescência.

quando comparados aos dos frutos não-climatéricos. Os frutos chamados de não-climatéricos possuem apenas um sistema de produção de etileno: o sistema 1. Nesse sistema, ocorre produção constante e mais baixa de etileno quando comparada com a dos frutos climatéricos (Figura 6.1).

O etileno pode ter efeitos desejáveis, como uniformizar o amadurecimento de alguns frutos. Mas seus efeitos também podem ser indesejáveis: quando o etileno provoca o amarelecimento de hortaliças folhosas ou quando acelera demasiadamente o amadurecimento de frutos, antecipando a senescência. Nesse caso, recomendam-se não armazenar produtos que produzam altas quantidades de etileno junto àqueles muito sensíveis a esse hormônio, trocar o ar das câmaras de armazenamento para evitar o acúmulo do gás e utilizar absorvedores de etileno (permanganato de potássio) e inibidores da ação de etileno (1-metilciclopropeno).

Mecanismos de ação e de inibição do etileno. O mecanismo de ação do etileno em nível molecular ainda é objeto de estudo. Primeiramente, o etileno liga-se a receptores específicos da membrana. Em seguida, ocorre a

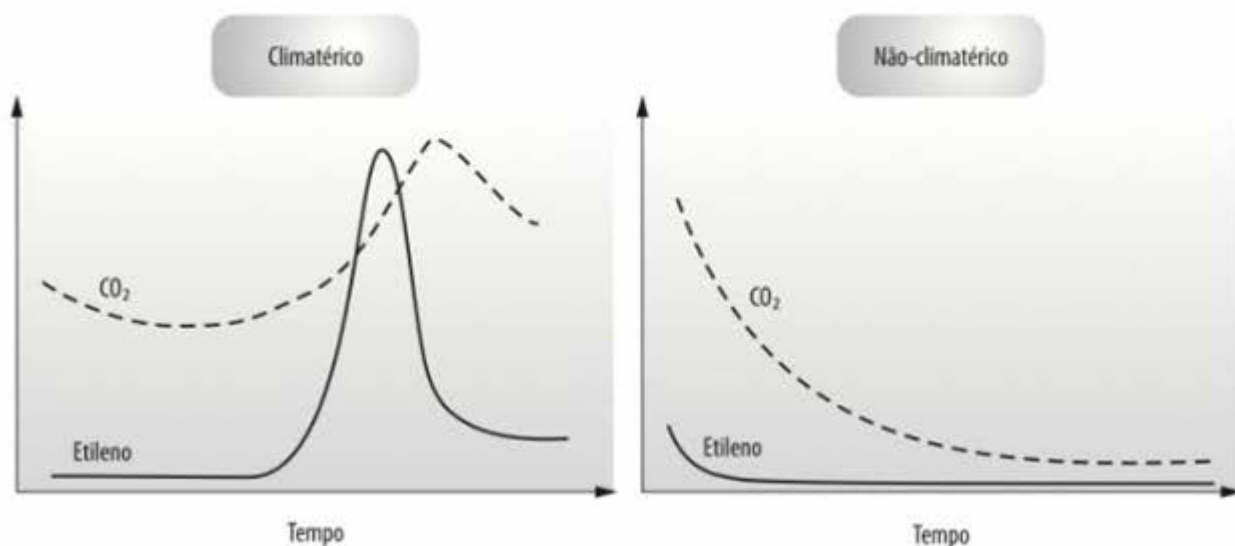


Figura 6.1 Produção de etileno e CO_2 em frutos climatéricos e não-climatéricos.

transdução; ou seja, a formação de mensageiros secundários que, no núcleo, induzem a atividade de determinados genes responsáveis pela transcrição de RNA-mensageiros. Esses RNA codificam proteínas específicas, responsáveis por uma série de mudanças no metabolismo vegetal; como, por exemplo, hidrólise de pectina, degradação da clorofila e síntese de carotenóides e aumento da atividade da ACC-oxidase.

O oxigênio é requerido para a conversão de ACC em etileno, juntamente com a atividade da enzima ACC-oxidase. Portanto, a redução do nível de O_2 disponível diminui a produção de etileno. Esse é um dos princípios do armazenamento dos produtos sob atmosfera modificada. Quanto à ação do etileno, sabe-se que tanto o baixo nível de O_2 quanto o alto nível de CO_2 diminuem a ação do hormônio. A Figura 6.2 apresenta um esquema da biossíntese do etileno.

Concentrações baixas de oxigênio inibem a atividade da ACC-oxidase, o que reduz a síntese de etileno e dificulta sua ligação aos sítios receptores. Altas concentrações de CO_2 competem com o etileno pelo sítio de ligação do receptor, impedindo que o etileno se ligue. Essas alterações na concentração de gases podem ser conseguidas pelo uso de embalagens com diferentes permeabilidades aos gases.

Os ciclopropenos, como o 1-metilciclopropeno (1-MCP), também competem com o etileno pelos sítios receptores, retardando a ação do hormônio. A aminoetoxivinilglicina (AVG) e o ácido aminoxiacético (AOA) são produtos que inibem a síntese de ACC e, portanto, a produção do etileno. O AOA e a AVG protegem o produto do etileno interno, enquanto o 1-MCP, por ligar-se ao sítio receptor, protege contra o etileno produzido pelo próprio fruto e contra o etileno de fontes externas.

Temperaturas acima de $30^\circ C$ podem impedir a produção de ACC-oxidase e, conseqüentemente, a do etileno.

O etileno liga-se a receptores na membrana celular, levando à síntese de enzimas responsáveis por alterações do metabolismo. Baixas concentrações de O_2 , além de inibidores químicos (AOA e AVG), reduzem a síntese do hormônio. Altas concentrações de CO_2 e ciclopropenos competem pelos sítios ativos, reduzindo a ação do etileno.

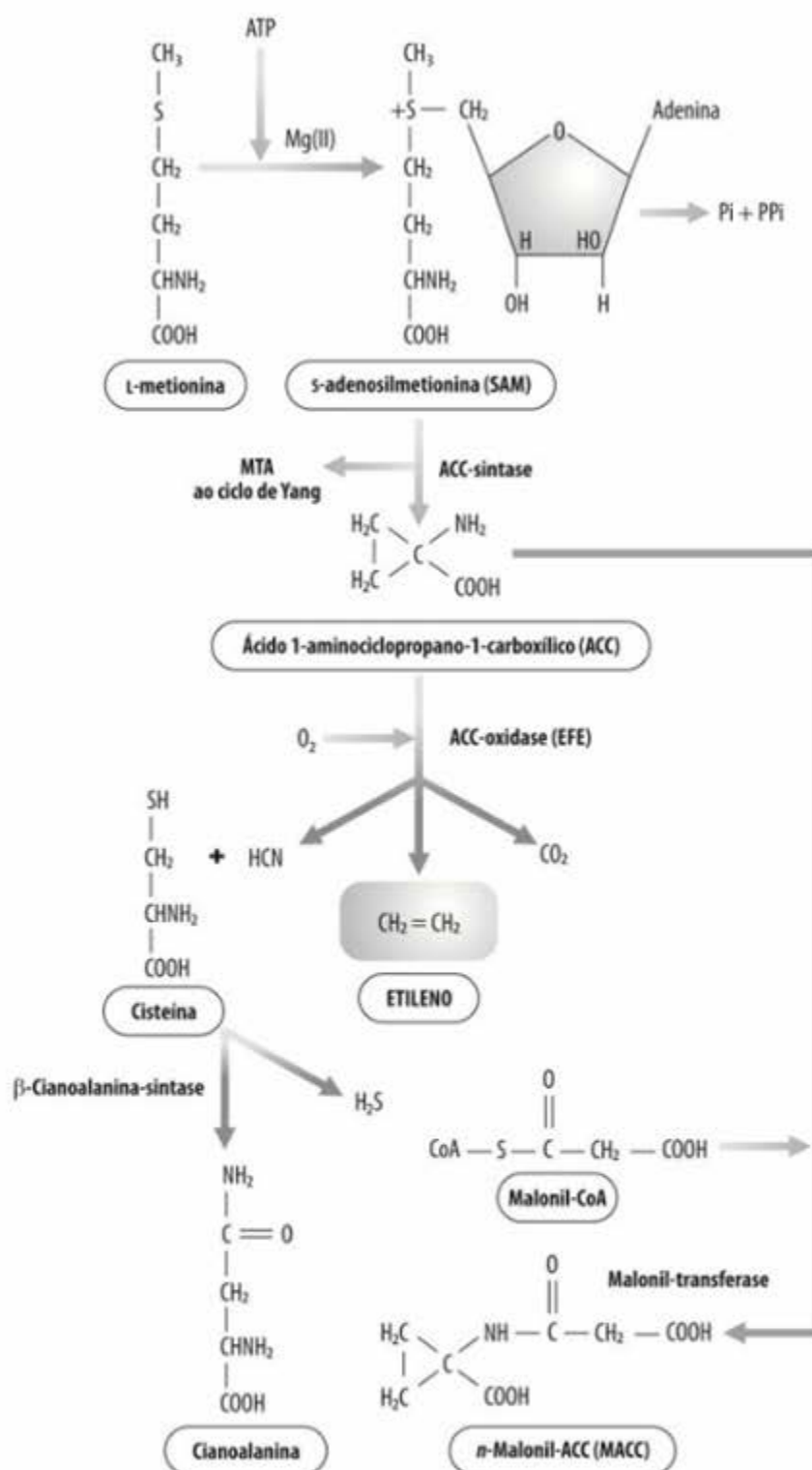


Figura 6.2 Biossíntese do etileno.

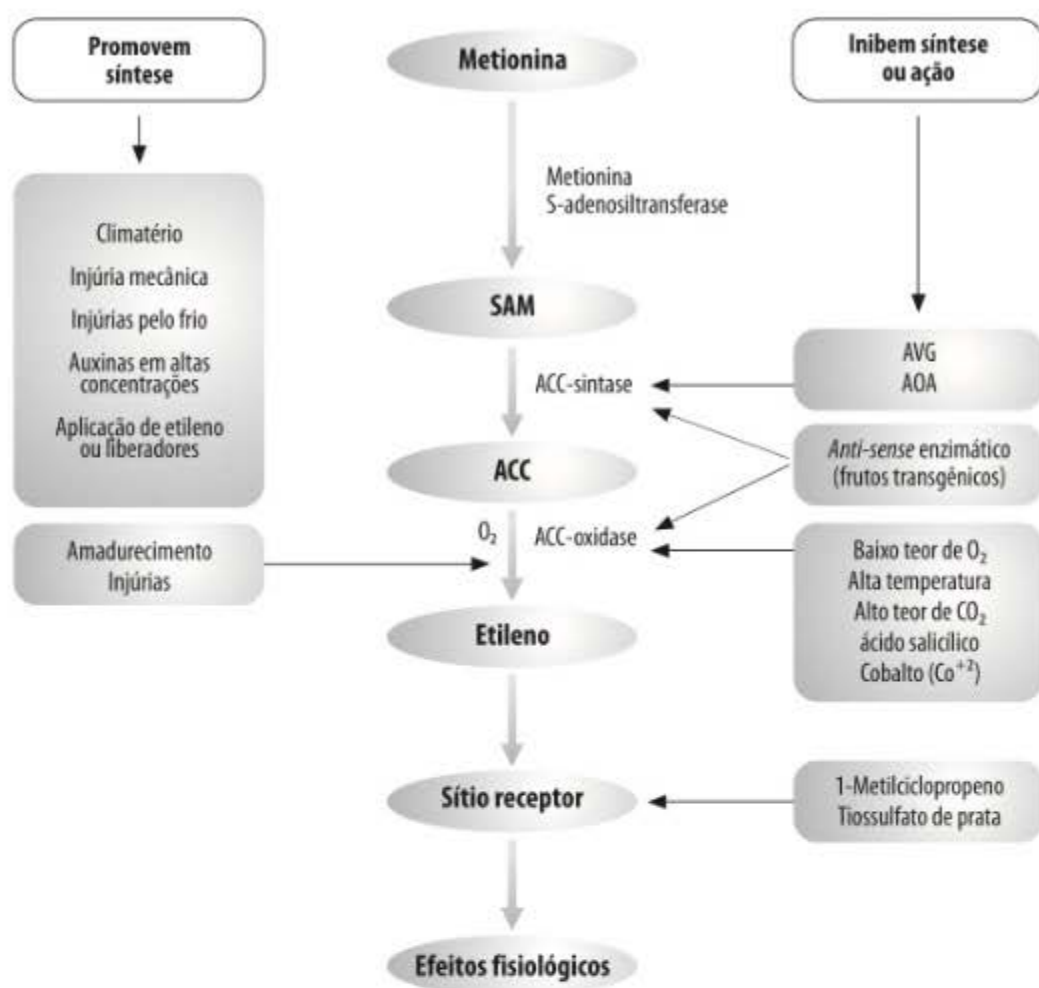


Figura 6.3 Fatores que influenciam a produção de etileno.

Frutos climatéricos podem ter seu amadurecimento antecipado por aplicação de etileno exógeno. Produtos geradores de etileno e hidrocarbonetos com ação similar podem ser utilizados na uniformização do amadurecimento de frutos climatéricos.

Os frutos climatéricos respondem à aplicação do etileno, ou seja, seu amadurecimento é antecipado, desde que a aplicação seja realizada em momento apropriado (após o fruto atingir o pleno crescimento, no pré-climatério) (Figura 6.4). Após a aplicação, o fruto produz etileno de maneira autocatalítica. Aplicação durante a ascensão climatérica não produz efeito. O mesmo ocorre quando o fruto não atingiu seu completo crescimento.

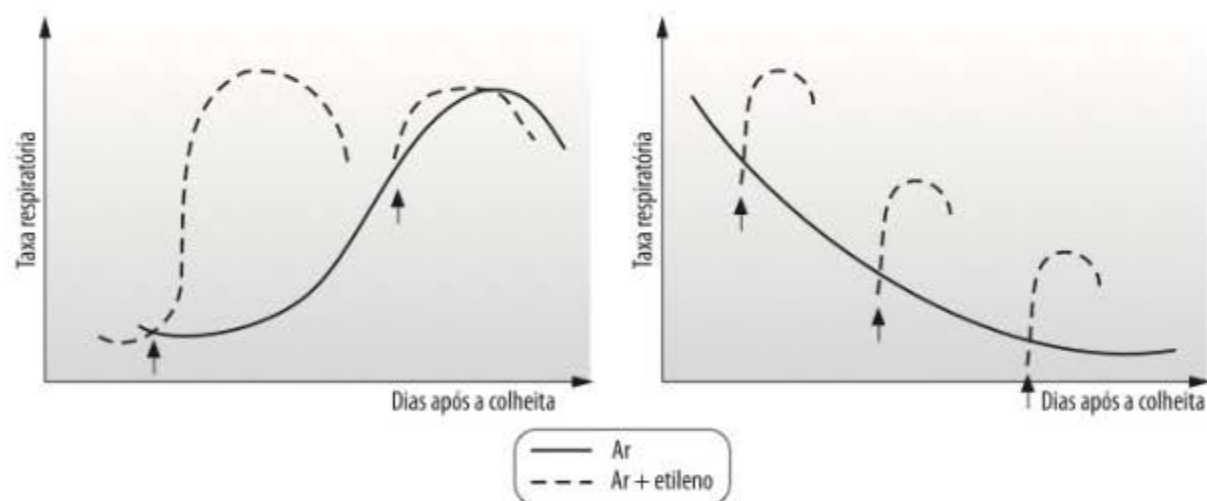
Nos frutos não-climatéricos, a aplicação de etileno, a qualquer momento, promove aumento da atividade respiratória por um determinado período. No entanto, a resposta só ocorre enquanto o etileno estiver em contato com o fruto, não havendo produção autocatalítica de etileno (Figura 6.4).

Para uniformizar o amadurecimento de determinados frutos, como, por exemplo, a banana, é possível a utilização de produtos geradores e liberadores de etileno, ou mesmo a injeção de mistura de gases que contenham etileno. Essa prática é chamada de *climatização da banana* e constitui-se uma prática rotineira na pós-colheita desse fruto. O etileno, se aplicado sozinho, é altamente explosivo, portanto usam-se misturas que contêm 95% de nitrogênio e 5% de etileno. Existem outros hidrocarbonetos com ação similar à do etileno, como, por exemplo, acetileno, propileno e butano.

Temperatura. A intensidade respiratória está intimamente relacionada à temperatura. A atividade respiratória pode ser reduzida pelo uso de baixa temperatura. Nessas condições, as reações bioquímicas, inclusive aquelas ligadas à senescência, têm sua velocidade reduzida. Em frutos climatéricos, o abaixamento da temperatura retarda o pico climatérico e reduz sua intensidade.

O Q_{10} é um quociente que postula que, a cada 10°C de variação na temperatura, a velocidade das reações metabólicas aumenta ou diminui 2 a 3 vezes, dentro

É possível reduzir a atividade respiratória e a velocidade das reações bioquímicas pelo armazenamento refrigerado. O produto deve ser exposto à menor temperatura possível (TMS – temperatura mínima de segurança) sem que haja alterações em seu metabolismo normal que caracterizem a injúria pelo frio.



- reage à aplicação de etileno somente se o etileno for aplicado antes do climatério.
- a intensidade da respiração no climatério independe da concentração de etileno aplicada.
- o padrão respiratório não é alterado, o que ocorre é a antecipação do pico.

- reage à aplicação de etileno em qualquer estágio de desenvolvimento.
- a ascensão respiratória é proporcional à concentração de etileno aplicada.
- a respiração volta ao padrão normal, quando o etileno é retirado (cessa causa, cessa efeito).

Figura 6.4 Resposta à aplicação exógena de etileno em frutos climatéricos (esquerda) e não-climatéricos (direita).

da faixa fisiológica de temperatura. É possível prever o tempo de armazenamento de uma fruta ou hortaliça e a velocidade de um determinado processo metabólico por meio do Q_{10} .

Durante o armazenamento refrigerado, o produto deve ser exposto a menor temperatura possível, sem que ocorra distúrbio fisiológico em decorrência da exposição ao frio. A essa temperatura mínima, damos o nome de *temperatura mínima de segurança* (TMS). Caso o produto seja exposto, por um determinado tempo, a temperaturas abaixo da TMS, o dano de frio pode manifestar-se. Quando isso acontece, a respiração inicialmente aumenta em uma tentativa para recuperação dos danos e, em seguida, diminui pela desestruturação celular.

No dano pelo frio, também conhecido como *chilling*, não ocorre a formação de cristais de gelo, como no congelamento; o que acontece é uma alteração no metabolismo normal dos produtos, levando a uma série de sintomas. Geralmente, frutos tropicais são mais suscetíveis a esses danos quando comparados com os originários de zonas temperadas.

A resposta primária de qualquer dano pelo frio é a alteração na membrana lipídica, que passa de uma fase líquido-cristalina para uma fase gel-sólida, levando à perda da permeabilidade seletiva. Esse processo conduz a respostas secundárias, como extravasamento de solutos, aumento da respiração e produção de etileno, acúmulo de compostos tóxicos, oxidação de fenóis (contato enzimas-substratos). Todas essas respostas conduzem a diferentes sintomas em diversas espécies. A Tabela 6.1 ilustra os principais danos causados por *chilling* em alguns produtos hortícolas.

É importante lembrar que o aparecimento dos sintomas ocorre, geralmente, quando os frutos são retirados do armazenamento refrigerado e expostos a temperaturas mais altas (temperaturas de amadurecimento).

A susceptibilidade aos danos pelo frio depende de fatores como: genótipo, estágio de maturação e binômio tempo-temperatura.

Tabela 6.1 Danos causados pelo frio em alguns produtos hortícolas.

Fruto	TMS (°C)	Sintomas de danos de frio entre o ponto de congelamento e a TMS
Abacate	9	Mudanças na cor da casca e polpa
Banana	13	Manchas marrons ou amarelo-acinzentadas na casca, escurecimento da polpa
Berinjela	10	Depressões e bronzeado na casca, escurecimento das sementes
Laranja	3	Depressões superficiais e necróticas
Mamão	12	Falhas no amadurecimento, depressões superficiais, sabor desagradável
Manga	12	Manchas acinzentadas ou marrons na casca, falha no amadurecimento, aumento nas podridões
Melão	7	Depressões e podridões
Quiabo	7	Depressões superficiais, descoloração, podridões
Tomate "de vez"	13	Pouco desenvolvimento de coloração, depressões
Tomate maduro	10	Amolecimento, encharcamento, podridões

A redução da concentração de O_2 e o aumento da de CO_2 pelo uso de atmosfera controlada ou modificada reduz a atividade respiratória. O desbalanceamento da atmosfera pode levar à fermentação alcoólica e à morte celular.

Concentração gasosa. A respiração pode ser reduzida pela elevação do teor de CO_2 e diminuição da concentração de O_2 na atmosfera de armazenamento do fruto. Isso é conseguido pelo uso da técnica de atmosfera controlada, em que ocorrem monitoramento e controle da composição gasosa a que o fruto fica exposto. Outra técnica é a atmosfera modificada, na qual a concentração de gases é modificada pela própria respiração dos frutos. A atmosfera modificada é criada por meio de uma barreira artificial (embalagens ou recobrimentos) à difusão de gases em torno da fruta ou hortalíça.

Altas concentrações de CO_2 reduzem a atividade das enzimas fosfofrutoquinase (glicólise), piruvato-desidrogenase, succinato-desidrogenase (ciclo de Krebs) e citocromo-oxidase (cadeia transportadora de elétrons). As enzimas piruvato-desidrogenase e citocromo-oxidase também têm sua atividade reduzida por baixas concentrações de O_2 .

O acúmulo de succinato, causado pelo decréscimo da succinato-desidrogenase, pode ser tóxico às células e

causar escurecimento dos tecidos. A inibição da piruvato-desidrogenase compromete a produção de acetil-CoA, composto essencial para síntese de compostos aromáticos, fundamentais para o aroma dos frutos.

Em condições de baixa concentração de oxigênio, ou mesmo ausência, o piruvato não é convertido em acetil-CoA para entrar no ciclo de Krebs e ocorrerá o processo de fermentação, que será acompanhado da produção de odores e sabores desagradáveis.

Os benefícios das modificações na atmosfera são observados quando os teores de CO_2 são elevados a 3 a 8% e os de O_2 reduzidos até 8 a 3%. É importante lembrar que esses teores variam de acordo com a espécie vegetal.

A utilização de embalagens e/ou recobrimentos, além de reduzir a atividade respiratória, cria uma barreira à difusão de vapor d'água, reduzindo a perda de água pelos tecidos do fruto e, conseqüentemente, retardando a desidratação e o murchamento dos produtos.

Os materiais de embalagem mais utilizados são filmes de PVC, polietileno e polipropileno. Em relação aos recobrimentos, os mais utilizados são aqueles à base de cera de carnaúba e polietileno. Outros materiais, como os lipídios (óleo ou cera de parafina, cera de abelhas, cera de carnaúba, óleo vegetal, óleo mineral etc.), polissacarídios (celulose, pectina, amido etc.) e proteínas (caseína, gelatina, albumina de ovo etc.) têm sido estudados, visando a originar recobrimentos comestíveis; entretanto, até o momento, há poucas aplicações comerciais.

Danos mecânicos. Todo e qualquer tipo de lesão mecânica às frutas e hortaliças pode causar um estímulo na atividade respiratória. As lesões mecânicas provocam a liberação de oligossacarídios provenientes da parede celular lesionada, que sinalizam a produção do chamado *etileno de ferimento*. Esse etileno é responsável por inúmeras mudanças no metabolismo celular como tentativa de reparo, como, por exemplo, a elevação da respiração. Além disso, os danos mecânicos são responsáveis pela

▼

O uso de recobrimentos e embalagens plásticas reduz a perda d'água pelo produto retardando alterações indesejadas de textura (murchamento).

▼

Injúrias aos tecidos vegetais levam à produção de *etileno de ferimento* que acelera a atividade respiratória.

descompartimentalização celular e, conseqüentemente, a elevação da respiração.

► Amadurecimento de produtos hortícolas: mudanças bioquímicas

► Mudanças na coloração

A coloração do fruto varia com as espécies e os cultivares. O critério mais importante utilizado pelo consumidor para julgar a maturidade do fruto baseia-se na mudança de cor que se observa durante o amadurecimento.

As mudanças na coloração dos frutos devem-se tanto à degradação quanto à síntese e revelação de pigmentos. Nos vegetais, podemos encontrar, mais comumente, os seguintes pigmentos:

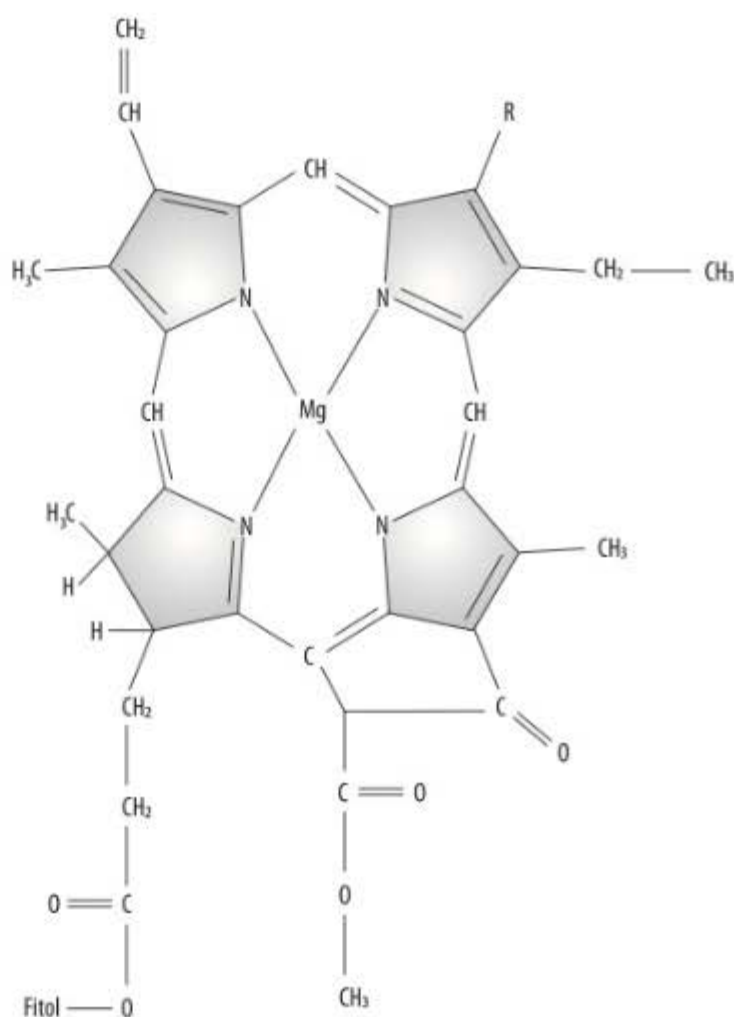
Clorofila

As clorofilas abundantes em hortaliças de folhas, flores e em frutos imaturos são responsáveis pela cor verde. São denominadas *clorofila a* e *clorofila b* e encontram-se sempre na proporção 1:3 (clorofila a:b). As clorofilas estão presentes nos cloroplastos, ancoradas às membranas lipoprotéicas.

A molécula de clorofila possui duas partes: a primeira é uma estrutura em anel chamada de porfirina, contendo em seu centro o íon Mg^{+2} , e a segunda, uma cadeia carbônica linear denominada fitol. As clorofilas a e b diferem entre si pela presença de um grupo $-CH_3$ ou $-CHO$ no carbono 3. Ambas possuem no carbono 7 o grupo fitol ($C_{20}H_{39}O$) esterificado, o que colabora para a maior solubilidade da molécula em lipídios do que em água. A Figura 6.5 ilustra a estrutura da clorofila.

A perda da cor verde deve-se à decomposição estrutural da clorofila. Esse processo é causado por mais de um fator que pode atuar em conjunto ou isoladamente. São eles: alteração do pH, atividade de enzimas (clorofilase), presença de sistemas oxidantes (enzimáticos ou químicos).

As mudanças na cor são consideradas o principal critério para julgar a maturidade do fruto pelo consumidor (nem sempre corretamente). São causadas pela degradação da clorofila (fortemente estimulada pelo etileno) e pela síntese ou revelação dos outros pigmentos: carotenóides (lipossolúveis de coloração vermelha a amarela) e antocianinas (fenólicos de coloração forte do vermelho ao roxo), entre outros.



Clorofila a: $R = CH_3$

Clorofila b: $R = H - C = O$

Figura 6.5 Estrutura da clorofila (Bobbio & Bobbio, 2003).

O íon de Mg^{+2} nas clorofilas é facilmente eliminado por reação com ácidos orgânicos provenientes do vacúolo, resultando dessa reação a feofitina de cor verde-oliva. Enzimas presentes no vegetal, como a clorofilase, separam o grupo fitol da porfirina, formando a clorofilida, verde, mais solúvel em água do que a clorofila. O fitol também pode ser removido facilmente por álcalis. Os produtos resultantes da perda do grupo fitol e do Mg^{+2} , os feofór-bios, têm cor verde-castanha. A feofitina, a clorofilida e o

feofórbio sofrem, possivelmente, transformações oxidativas que dão origem a produtos de degradação incolores.

A perda da coloração verde pode ser desejável ou não, dependendo da espécie. Em frutos como laranja, banana, tomate, a perda da coloração verde é desejável; enquanto em lima ácida, do tipo Tahiti, e em hortaliças folhosas, a perda da cor verde deprecia os produtos.

Tratamentos com etileno têm sido utilizados para garantir a coloração desejada de maneira uniforme e mais rápida. Geralmente, utilizam-se misturas que contêm etileno e são aplicadas em uma câmara hermética com temperatura controlada. A renovação de ar dentro da câmara também deve ser realizada a fim de evitar que o CO_2 liberado pelos frutos acumule-se e interfira na ação do etileno. Esse tratamento é utilizado comercialmente, no Brasil, em laranjas, principalmente as destinadas à exportação, e em bananas. Em alguns países, é utilizado também em tomate e mamão-papaia.

Em lima ácida, utilizam-se reguladores vegetais para retardar a perda da cor verde. Comercialmente, o mais utilizado é o ácido giberélico, que apresenta efeito retardador da senescência, uma vez que retarda a degradação da clorofila e a síntese e/ou revelação de carotenóides. Os frutos tratados com ácido giberélico retêm a coloração verde da casca por mais tempo. Recentemente, o 1-metilciclopropeno (1-MCP) vem sendo bastante estudado. Esse regulador liga-se permanentemente ao sítio receptor do etileno, impedindo sua ação. Após certo período de tempo, novos sítios são sintetizados e o etileno age normalmente. Nesse caso, a ação do etileno desencadeia a atividade da clorofilase, responsável pela degradação da clorofila.

Carotenóides

Os carotenóides (carotenos e xantofilas, seus derivados oxigenados) formam um dos grupos de pigmentos mais difundidos na natureza, sendo responsáveis pela

coloração amarela, laranja e vermelha de grande variedade de frutos e hortaliças. São solúveis em lipídios e seus solventes. Os pigmentos carotenóides podem já estar presentes, tornando-se visíveis com a degradação da clorofila ou podem ser sintetizados simultaneamente com a degradação da clorofila.

Nos frutos cítricos e na banana, a síntese de carotenóides ocorre durante o desenvolvimento do fruto e bem antes do desaparecimento da clorofila. Nesse caso, a destruição da clorofila revela a presença de carotenóides.

Em tomate, os carotenóides são sintetizados simultaneamente com a degradação da clorofila. O licopeno é o pigmento que predomina nos tomates, representando mais de 80% dos carotenóides do fruto. A Figura 6.6 ilustra as alterações dos pigmentos em tomate durante o amadurecimento.

A síntese de carotenóides pode estar, em certos casos, sob controle do fitocromo. Nessa hipótese, a luz vermelha (600 a 700 nm) induz a síntese de licopeno, enquanto a luz vermelha longa inibe a síntese desse pigmento. A temperatura também afeta sua síntese: temperaturas baixas, durante a fase de maturação dos frutos, favorecem a síntese de carotenóides e temperaturas acima de 30°C inibem a síntese, provavelmente pela inibição da ACC-oxidase.

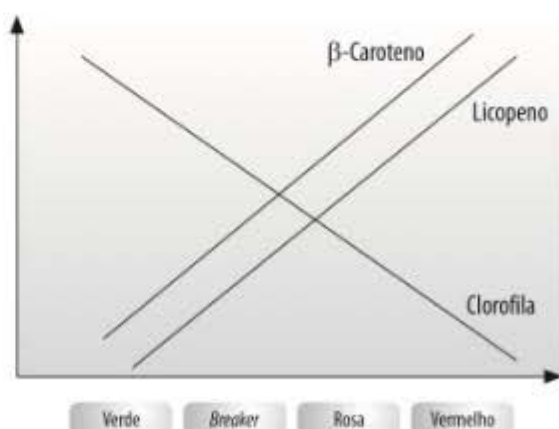


Figura 6.6 Alterações dos pigmentos em tomate durante o amadurecimento.

Tabela 6.2 Alguns carotenóides encontrados na natureza
(Bobbio & Bobbio, 2003).

<i>Carotenóide</i>	<i>Fonte</i>
α -caroteno	Cenoura
β -caroteno	Tomate, cenoura, manga, abóbora
Capsantina	Pimenta-vermelha
Criptoxantina	Mamão
Licopeno	Tomate, melancia

Tomates colhidos no verão não adquirem coloração vermelha desejável da casca em virtude da temperatura elevada durante a fase de maturação. Nesse caso, pode-se realizar o amadurecimento com etileno, sob temperatura controlada.

Para a plena manifestação dos carotenóides e degradação da clorofila, são ideais dias quentes seguidos por noites frias. Temperaturas na faixa de 20 a 25°C durante o dia e 10 a 15°C durante a noite são ideais para o desenvolvimento de coloração da casca de citros. Isso explica o fato de as laranjas produzidas no Sul do Brasil apresentarem melhor coloração do que aquelas produzidas no Nordeste.

Os carotenóides mais importantes são o β -caroteno (amarelo), precursor da vitamina A, e o licopeno (vermelho), que depende da luz para a sua síntese. A Tabela 6.2 ilustra alguns carotenóides e suas respectivas fontes.

A estrutura do licopeno (Figura 6.7) é considerada a estrutura fundamental dos carotenóides.

Antocianinas

As antocianinas são pigmentos responsáveis por uma variedade de cores atrativas de frutos e hortaliças que variam do vermelho-alaranjado (p. ex., morango) ao roxo (p. ex., uva) passando pelo vermelho-vivo (p. ex., cereja-vermelha).

A variação de cores e formas desse pigmento é dependente do pH. Em meio ácido, as antocianinas encontram-se

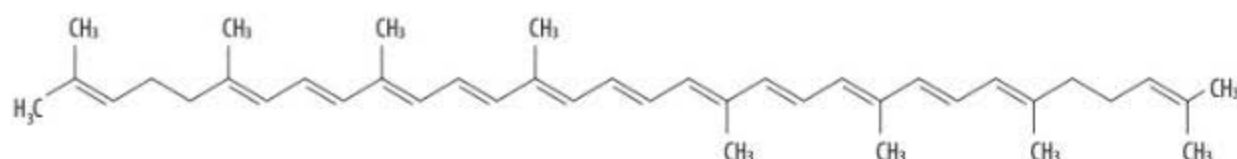


Figura 6.7 Estrutura do licopeno (Bobbio & Bobbio, 2003).

na forma de sais de oxônio e geralmente apresentam cor vermelha-brilhante. Com o aumento do pH, as antocianinas apresentam estrutura quinoidal e cor púrpura e, em meio alcalino, sua cor é azul. Esses pigmentos encontram-se nos vacúolos celulares e nas camadas superficiais da epiderme. Por serem de cor forte, em geral ocultam a clorofila e os carotenóides.

Em alguns frutos que contêm antocianinas na casca, a síntese desses pigmentos é dependente da intensidade e da qualidade da luz. Em alguns frutos, a energia luminosa direta é desnecessária. A síntese também é controlada pela temperatura. O declínio ou o aumento progressivo da temperatura podem reduzir a capacidade de síntese.

Antoxantinas

Dependendo da estrutura, têm cor amarela de várias tonalidades ou não têm cor. São pouco sensíveis aos efeitos da luz, ao contrário das antocianinas. São pigmentos facilmente oxidados pelo oxigênio do ar com formação de produtos escuros.

Algumas das antoxantinas mais importantes e suas respectivas fontes estão na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 Antoxantinas e respectivas fontes.	
<i>Antoxantina</i>	<i>Fonte</i>
<i>Hesperitina</i>	Laranja
<i>Kaempferol</i>	Morango
<i>Miricetina</i>	Uva
<i>Naringenina</i>	Grapefruit (toranja), laranja
<i>Quercetina</i>	Cebola, morango
<i>Tangeritina</i>	Tangerina

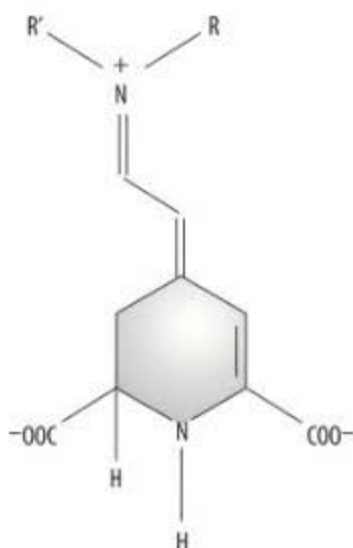


Figura 6.8 Estrutura da betalaina (Bobbio & Bobbio, 2003).

Betalainas

São pigmentos que se assemelham em aparência e comportamento às antocianinas. Na literatura antiga, eram conhecidas como antocianinas nitrogenadas.

As betalainas foram encontradas até hoje somente em uma ordem de vegetais, a Centrospermae, à qual pertence a beterraba (*Beta vulgaris*), e da qual são facilmente extraídas com água. São conhecidas aproximadamente 70 betalainas, todas com a mesma estrutura fundamental.

Pertencem às betalainas os pigmentos vermelhos, denominados betacianinas, e os pigmentos amarelos, denominados betaxantinas. Na beterraba, o principal pigmento encontrado é uma betacianina, denominada betanina, e mais dois pigmentos amarelos, denominados vulgaxantina I e vulgaxantina II.

As betalainas são menos sensíveis à variação de pH do que as antocianinas. São bastante estáveis em pH de 4 a 5 e apresentam estabilidade razoável no intervalo de pH de 3 a 7. São instáveis em presença de luz e ar e destruídas quando submetidas a altas temperaturas.

► Mudanças nos compostos voláteis

Os compostos voláteis são responsáveis pelo aroma dos vegetais. São eles: cetonas, aldeídos, ésteres, alcoóis

A produção de compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos frutos está diretamente relacionada ao amadurecimento. Modificações na atmosfera de armazenamento podem causar alterações no odor característico.

e ácidos voláteis. Sua produção está relacionada diretamente ao processo de amadurecimento do fruto e aos fatores que o influenciam, como temperatura, composição atmosférica, presença de etileno, entre outros.

Durante o amadurecimento, a maioria dos frutos libera mais de cem compostos voláteis em concentrações muito pequenas e somente um ou dois desses compostos são responsáveis pelo aroma característico do fruto. A Tabela 6.4 relaciona os compostos voláteis responsáveis pelo aroma característico de algumas frutas e hortaliças.

Os frutos não-climatéricos sintetizam compostos voláteis em menor quantidade e com aroma menos intenso que os compostos produzidos pelos climatéricos, sem que essas características diminuam sua importância na formação do sabor (*flavor*) do fruto.

Alterações da composição gasosa ao redor dos frutos, pela técnica de atmosfera controlada ou modificada, podem causar uma certa redução na produção de compostos voláteis responsáveis pelo odor característico dos frutos. Assim, teores demasiadamente altos de CO₂ na atmosfera

Tabela 6.4 Compostos responsáveis pelo aroma característico de alguns produtos hortícolas.

<i>Produto hortícola</i>	<i>Composto volátil</i>
<i>Abacaxi</i>	Ésteres 3-metila-tiopropionato
<i>Banana madura</i>	Eugenol
<i>Banana passada</i>	Isopentanol
<i>Banana verde</i>	2-hexenal
<i>Batata</i>	2-metoxi-3-etilpirazina, 2,5-dimetilpirazina
<i>Laranja</i>	Limoneno
<i>Limão</i>	Citral
<i>Manga</i>	Butanoato de etila, terpinoleno
<i>Maracujá</i>	N-hexanoato, N-butirato de n-hexila
<i>Marmelo</i>	Propionato de etila, acetaldeído
<i>Morango</i>	Acetato de butila
<i>Pepino</i>	2,6-nonadienal
<i>Pêssego</i>	Benzaldeído, lactonas
<i>Uva</i>	Antranilato de metila

Adaptado de Wills *et al.*, 1998; Chitarra, 1990.

de armazenamento, além de causarem toxicidade celular, podem resultar em menor produção de compostos voláteis. Isso ocorre porque afetam a atividade da enzima piruvato-desidrogenase, a qual converte piruvato em acetil Co-A, que por sua vez é precursor de muitos compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos produtos.

Além disso, sob condições de O_2 muito reduzido, podem ser produzidos odores desagradáveis, como resultado do acúmulo de acetaldeído e etanol, causado pelo processo fermentativo.

► Mudanças nos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que apresentam radicais hidroxilas ligados a um anel benzênico. A síntese dos compostos fenólicos está relacionada a duas rotas metabólicas básicas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (Figura 6.9). Muitas dessas substâncias estão relacionadas à coloração das frutas; na presença de oxigênio, os compostos fenólicos são oxidados, ocorrendo a formação de pigmentos escuros, o que prejudica a aparência dos produtos hortícolas. Outras substâncias, denominadas taninos, estão relacionadas ao sabor e são responsáveis pela adstringência.

Os taninos são compostos fenólicos bastante estudados em pesquisas sobre o comportamento pós-colheita de frutos para medir o grau de adstringência dos frutos. A adstringência produz uma sensação desagradável na boca e é comum em frutos de caju, banana e caqui, quando degustados ainda “verdes”. Os taninos do fruto verde são solúveis e reagem com proteínas e glicoproteínas da saliva, o que causa sua precipitação, diminuindo sua ação lubrificante. Durante o amadurecimento dos frutos, há um aumento gradual na condensação dos taninos, ao mesmo tempo em que a adstringência diminui. Isso provavelmente ocorre porque as formas altamente condensadas são menos solúveis e, portanto, reagem menos com as proteínas da boca.

Taninos são compostos fenólicos de baixa massa molecular responsáveis pela sensação de adstringência. São condensados ao longo do amadurecimento, perdendo sua capacidade complexante de proteínas. Em frutos com alta adstringência pode ser necessário um processo de destanização provocada.

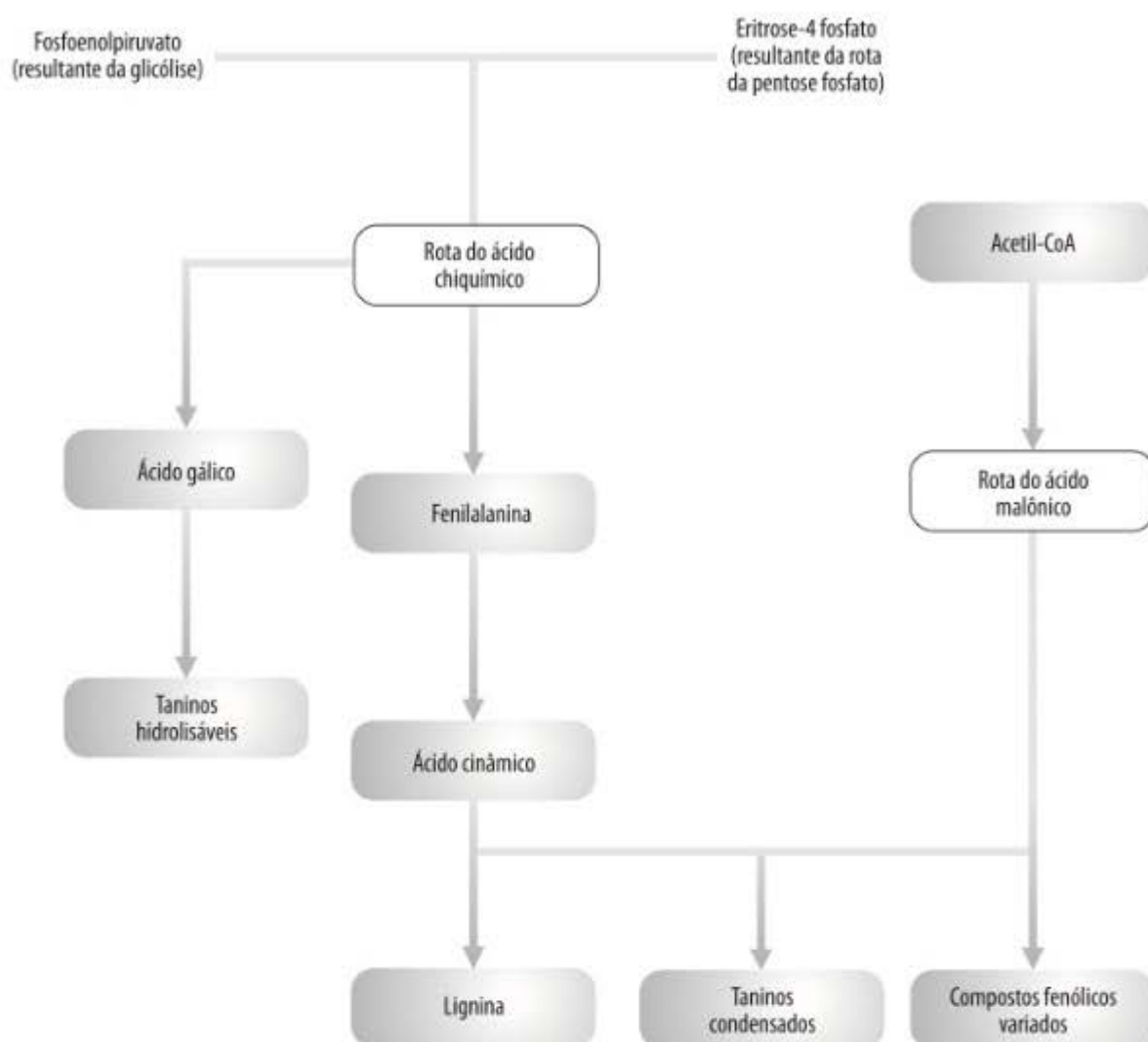


Figura 6.9 Rota do ácido chiquímico e do ácido malônico (Taiz & Zeiger, 2004).

O desaparecimento da adstringência pode ser natural ou induzido por via artificial. Algumas variedades de caqui apresentam a característica de adstringência, mesmo quando os frutos estão maduros. Nesse caso, torna-se necessária a destanização artificial pela exposição dos frutos ao vapor de etanol, ácido acético ou altas concentrações de CO_2 . Esses compostos favorecem a produção de acetaldeído, responsável pela destanização do fruto, visto que o acetaldeído reage com o tanino solúvel, formando tanino insolúvel e não-adstringente (Figura 6.10).

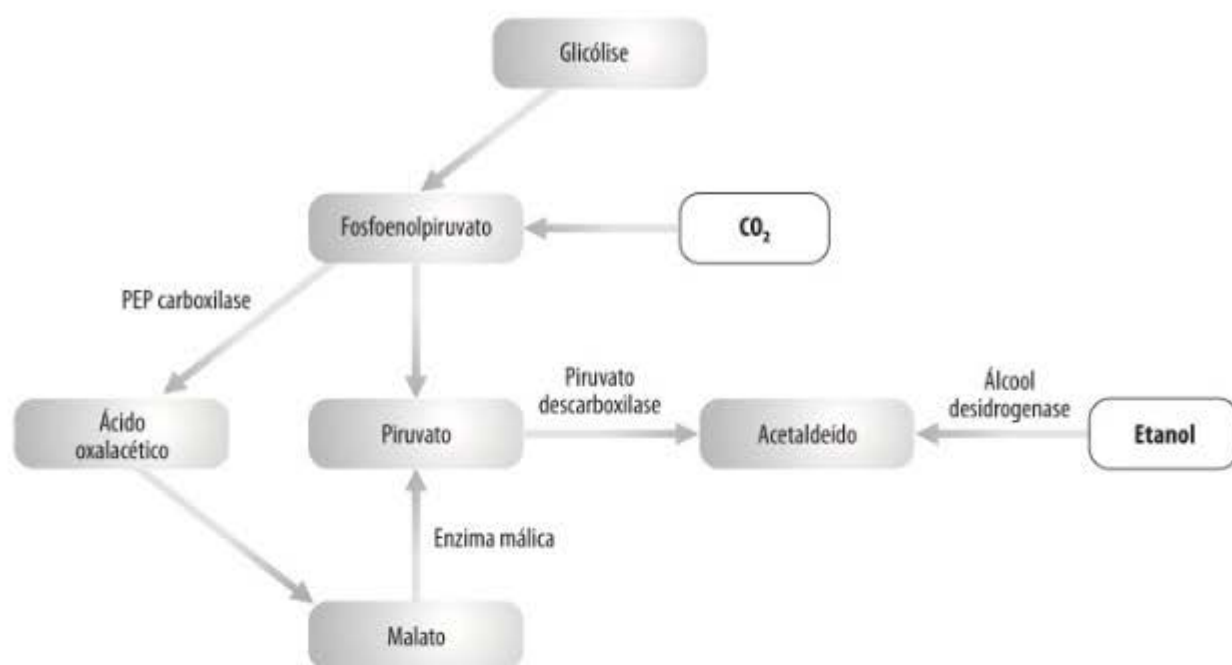


Figura 6.10 Indução da síntese de acetaldeído para destanização dos compostos fenólicos.

► Mudanças nos ácidos e vitaminas

Os ácidos são fonte de energia para o fruto e sua concentração tende a cair ao longo da maturação. São importantes componentes do aroma e do sabor. A concentração de ácido ascórbico, que tem atividade de vitamina C, pode aumentar em alguns frutos, caindo apenas na senescência.

Os ácidos são encontrados nos vacúolos das células, na forma livre e/ou combinados com sais, ésteres e glicosídeos, como importantes fontes de energia para os frutos, durante o processo de maturação; por conseguinte, é de se esperar que seu conteúdo diminua durante o período de atividade metabólica máxima dos vegetais.

Alguns ácidos orgânicos são voláteis e contribuem para o aroma de muitas frutas. Os frutos apresentam certa quantidade de ácidos que, em balanço com os teores de açúcares, representam um importante atributo de qualidade para o sabor.

Durante a maturação e o armazenamento, os ácidos sofrem oxidação no ciclo de Krebs. Os ácidos predominantemente encontrados nas frutas e hortaliças são málico, cítrico, tartárico, acético, oxálico, chiquímico, entre outros.

As vitaminas essenciais à saúde humana têm nas frutas e hortaliças as suas principais fontes. Dentre as vitaminas, destacam-se a vitamina C, a pró-vitamina A (β -caroteno),

ácido pantotênico, a biotina, a riboflavina, a tiamina, o ácido fólico e o ácido nicotínico.

A vitamina C é encontrada na quase totalidade das frutas e hortaliças. O ácido L-ascórbico é o principal composto, com 100% de atividade de vitamina C. O seu produto de oxidação, o ácido L-desidroascórbico tem a mesma atividade biológica da vitamina C, mas é pouco estável. Após sua formação, sofre uma reação de abertura do anel para formar 2,3-diceto-L-gulônico, que carece de atividade vitamínica. Sua formação é praticamente instantânea em pH alcalino, rápida ao redor da neutralidade e lenta em condições ácidas. Por esse fato, frutas cítricas possuem boa estabilidade da vitamina C.

O isômero óptico do ácido L-ascórbico é o ácido eritórbrico que não possui atividade vitamínica, porém se comporta de modo semelhante ao ácido L-ascórbico em inúmeros sistemas redox e, portanto, tem sido utilizado como antioxidante. A seguir, são ilustradas as estruturas dos ácidos L-ascórbico e L-desidroascórbico (Figura 6.11).

A biossíntese do ácido ascórbico nos vegetais é um processo não completamente entendido. Atualmente tem sido proposto que a biossíntese do ácido ascórbico em plantas tem como precursores a D-manose e a L-galactose.

O conteúdo de ácido ascórbico diminui durante o amadurecimento em alguns frutos e em outros aumen-

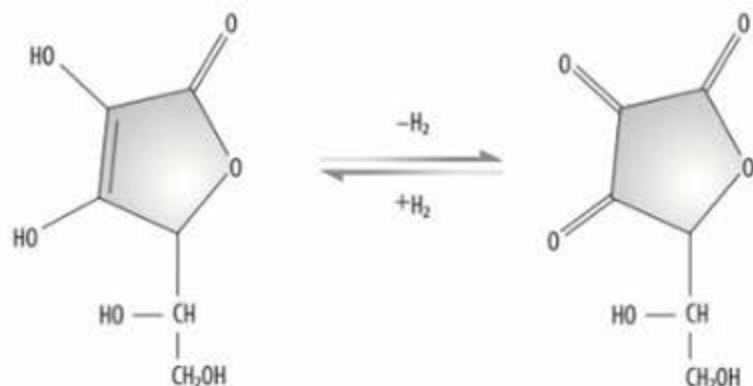


Figura 6.11 Estruturas químicas dos ácidos ascórbico e desidroascórbico.

ta, reduzindo-se somente na senescência. O aumento provavelmente está relacionado à liberação de açúcares precursores da biossíntese do ácido ascórbico durante o processo de degradação da parede celular, enquanto a redução está relacionada à oxidação do ácido. Danos mecânicos, apodrecimento e senescência promovem sua oxidação.

► Mudanças nos carboidratos

Nos vegetais, podemos encontrar carboidratos nas seguintes formas:

- monossacarídeos: glicose, frutose
- dissacarídeos: sacarose
- polissacarídeos:
 - amido → reserva
 - celulose
 - hemicelulose
 - pectina } estruturais

▼

Durante sua formação o fruto acumula amido, que é hidrolisado na maturação, aumentando sua doçura. A hidrólise de carboidratos estruturais, associada à transpiração, leva à perda de textura.

Durante o desenvolvimento do fruto ocorre a translocação dos carboidratos produzidos pela planta-mãe em direção aos frutos. Nos frutos que não acumulam amido, como o mamão, o teor de açúcares varia muito pouco durante o amadurecimento. O teor de açúcar com o qual o fruto é colhido é, geralmente, o teor que terá no momento do consumo. Nos frutos que acumulam amido, normalmente a doçura aumenta com o progresso do amadurecimento pela quebra do amido em açúcares menores, conferindo sabor adocicado ao fruto.

A quantidade de açúcares pode diminuir com o progresso do amadurecimento devido à utilização desse substrato na respiração dos frutos.

O amolecimento dos frutos é causado pela perda de turgor (transpiração) e pela degradação da parede celular. A parede celular dos frutos é constituída por celulose, hemicelulose, proteínas estruturais, lignina e, principalmente, pectina.

Pectina é um nome dado a um grupo de polissacarídeos ramificados presentes na parede celular dos vegetais. A pectina mais simples é o ácido poligalacturônico, constituída pela ligação α -1,4 entre açúcares e ácidos galacturônicos. Uma das substâncias pécticas mais abundantes é o ramnogalacturano I, constituído por ácidos galacturônicos e açúcares neutros, como a ramnose. Das ramnoses originam-se cadeias laterais constituídas de outros açúcares, como arabinanas, galactanas, arabinogalactanas. Duas cadeias de ácido poligalacturônico podem unir-se pelo íon cálcio e formar a protopectina, altamente insolúvel.

As principais modificações durante o amaciamento dos tecidos são atribuídas à degradação das pectinas (principais constituintes da lamela média). Nesse processo, ocorre a perda de coesão entre as células, e o fruto começa a perder a firmeza dos tecidos.

A celulose e as hemiceluloses são degradadas à glicose pelas enzimas celulase e glucanase-transglicosidase, respectivamente. A protopectina é degradada pela protopectinase, que remove o cálcio.

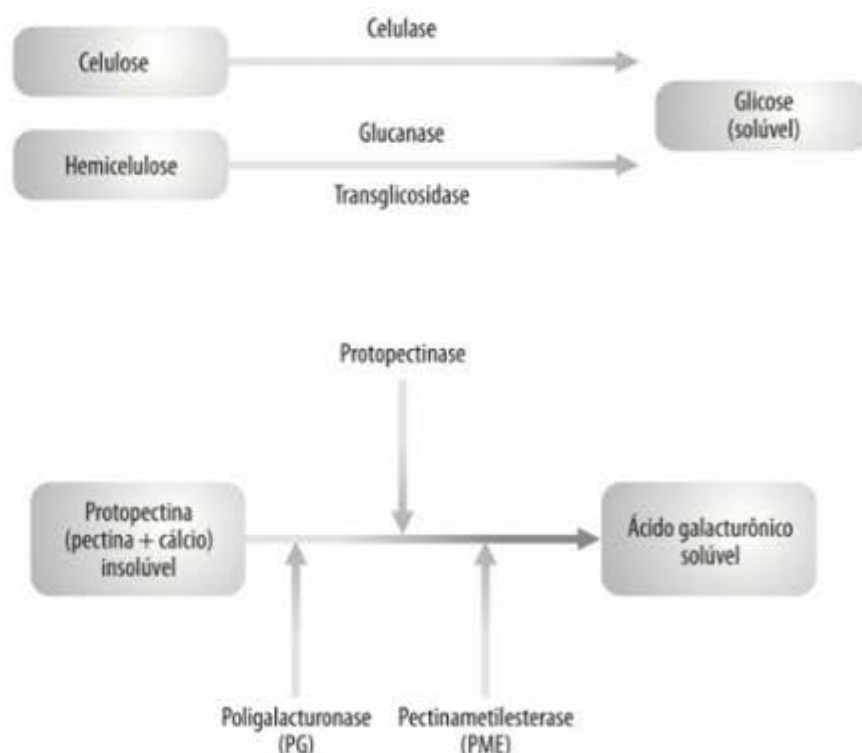


Figura 6.12 Degradação de carboidratos durante o amadurecimento.

A pectina é degradada por uma série de enzimas, como a poligalacturonase (PG), pectinametilesterase (PME), a β -galactosidase (β -Gal).

A PG hidrolisa as ligações entre os ácidos galacturônicos, enquanto a PME desesterifica os grupos carboxílicos dos ácidos galacturônicos metoxilados (Figura 6.13). A desesterificação dos grupos carboxílicos pela PME é necessária para a atividade da PG.

A β -Gal degrada as galactanas que ligam as cadeias laterais das pectinas ao esqueleto de ácido poligalacturônico. O esquema mostrado na Figura 6.12 ilustra a degradação de carboidratos durante o amadurecimento de frutos.

► Frutas e hortaliças minimamente processadas

Produtos minimamente processados são produtos frescos prontos para o consumo (descascados, lavados e cortados). Apresentam rápida deterioração causada pela produção de *etileno de fermento*, pela suscetibilidade ao ataque microbiano e pela ocorrência de reações enzimáticas indesejadas.

Os produtos minimamente processados são frutas e hortaliças frescas, apresentadas em tamanhos reduzidos, prontas para o consumo. De forma geral, as operações que envolvem o preparo desses produtos são: seleção da matéria-prima, lavagem, sanificação, descascamento, corte, enxágüe, centrifugação e embalagem.

► Mudanças bioquímicas

Um dos maiores problemas dos produtos minimamente processados é a sua rápida deterioração. As lesões provocadas nos tecidos, por ocasião do corte, elevam a ati-

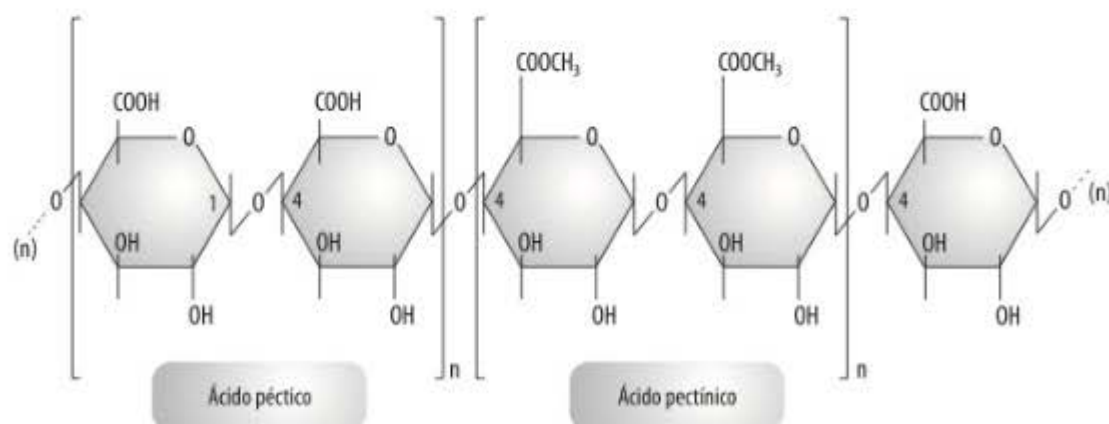


Figura 6.13 Estrutura química do ácido poligalacturônico.

vidade respiratória e a produção de etileno (chamado de *etileno de fermento*), contribuindo para a síntese de enzimas responsáveis por uma série de reações bioquímicas. Além disso, o processamento mínimo expõe o conteúdo celular, propiciando a proliferação de microrganismos. As principais respostas bioquímicas dos produtos submetidos ao processamento mínimo são descritas a seguir.

Alterações da coloração

As alterações de coloração dos tecidos envolvem escurecimento enzimático, amarelecimento e descoloração.

Escurecimento enzimático. A lesão dos tecidos de um vegetal provoca perda ou redução da compartimentalização celular, acarretando extravasamento de substratos do vacúolo e subsequente reação com enzimas presentes no citoplasma. Um dos exemplos é o extravasamento de substratos fenólicos do vacúolo que entram em contato com as enzimas catalisadoras das reações de oxidação dos polifenóis (polifenol-oxidase ou PFO) presentes no citoplasma. O resultado dessa reação é o escurecimento enzimático, comum em batata, pêra e maçã cortados. A intensidade do escurecimento em diversos tecidos pode ser afetada pela atividade relativa da PFO e pela concentração de substratos. Isso explica por que algumas frutas escurecem e outras não. Outros fatores que determinam a intensidade de escurecimento são a disponibilidade de O_2 , a temperatura, o pH e a atividade de água.

Amarelecimento. A falta ou a redução na compartimentalização celular ativa o sistema gerador de etileno, estimulando sua síntese e promovendo degradação da clorofila. Esse fato deprecia a aparência de hortaliças folhosas.

Descoloração. A lesão causada pelo processamento também pode induzir ao processo de "*cicatrização de ferida*", pela produção de lignina, muito comum em cenoura minimamente processada, que, por esse fato, apresenta vida de prateleira limitada, pois a deposição de lignina nos tecidos forma uma camada esbranquiçada.

As principais alterações de cor se devem ao escurecimento enzimático (ação da PFO), à degradação da clorofila (em resposta ao etileno) e à síntese de lignina no processo de cicatrização de ferida. A oxidação do ácido ascórbico pode levar ao escurecimento químico e à perda de valor nutricional. O sabor se altera por ação de peroxidases e pela síntese de isocumarina (amargo e tóxico); a textura se deteriora pela ativação das pectinases na presença de etileno.

A descoloração também pode ser resultante das operações do processamento: a lavagem, a sanificação e o enxágüe favorecem a lixiviação de pigmentos com conseqüente descoloração dos tecidos. Isso é muito comum em raízes de beterraba, cujo pigmento (betalaína) é solúvel em água.

Alterações de sabor e aroma

A peroxidação enzimática é um exemplo das modificações bioquímicas de aromas de vegetais minimamente processados. A peroxidação é catalisada pela enzima peroxidase e leva à formação de inúmeros aldeídos e cetonas, responsáveis pelos sabores e odores desagradáveis.

A composição atmosférica também afeta o sabor e o aroma dos produtos; o etileno estimula a síntese de um composto amargo e tóxico, a isocumarina, que pode estar presente em cenoura minimamente processada. Concentrações de CO₂ acima daquela tolerada pelo vegetal e/ou de O₂ muito baixas podem induzir à fermentação, causando a produção de odores e sabores desagradáveis.

Alterações na textura

A perda de firmeza dos produtos minimamente processados está relacionada à ação de enzimas, como pectinametilesterase, poligalacturonase, celulase e β -galactosidase, que são ativadas pelo etileno de fermento.

Alterações no conteúdo de ácido ascórbico

Outra conseqüência do processamento mínimo é a redução do teor de ácido ascórbico (vitamina C), que pode ser destruído por uma série de mecanismos químicos e bioquímicos, responsáveis não só pela perda de sua atividade vitamínica, como também pela formação de pigmentos escuros.

► Conservação de produtos hortícolas minimamente processados

A conservação dos produtos hortícolas minimamente processados é um processo complexo, pois algumas cé-

▼
A conservação de produtos minimamente processados começa com a escolha de matéria-prima de qualidade, higiene no processamento e uso de embalagens adequadas. A refrigeração e as alterações na atmosfera retardam as transformações bioquímicas e controlam a contaminação microbiana. Tratamentos químicos podem ser aplicados no controle das reações enzimáticas de escurecimento e amolecimento dos tecidos.

lulas encontram-se com atividade respiratória normal, células danificadas apresentam maior atividade respiratória e outras células estão mortas ou inativas. Os cuidados a serem tomados, visando a prolongar a vida útil desses produtos, devem iniciar-se pela escolha da matéria-prima de qualidade, utilização de técnicas de preparo adequadas, higienização do produto, ambiente e operadores, cadeia de frio e embalagem adequada.

O controle da temperatura é a técnica mais importante para reduzir o metabolismo e retardar o crescimento microbiano. A influência da temperatura na velocidade das reações metabólicas, em produtos minimamente processados, é geralmente maior que nos produtos inteiros. A redução da temperatura diminui a respiração e a produção de etileno e, em alguns produtos, reduz o escurecimento. O abaixamento da temperatura reduz a atividade enzimática, exceto de peroxidases, que permanecem ativas mesmo sob temperatura de congelamento.

O emprego de embalagens que promovam modificação da atmosfera em seu interior, também é desejável, visto que a alteração da composição gasosa apresenta efeitos diretos nos processos fisiológicos e bioquímicos do vegetal minimamente processado, bem como na redução da proliferação microbiana e, desse modo, aumenta a vida de prateleira dos vegetais.

Atmosferas com 2 a 8% de O_2 e 5 a 15% de CO_2 têm potencial para preservar a qualidade de frutas e hortaliças minimamente processadas, embora, para cada vegetal, exista uma atmosfera específica que maximiza sua durabilidade.

O conhecimento do nível mínimo de O_2 requerido para a respiração é muito importante, a fim de se evitarem condições anaeróbias no interior das embalagens, com conseqüente formação de etanol, aldeídos e cetonas em níveis que promovam a perda de qualidade do produto.

Os níveis de O_2 e CO_2 ideais para frutas e hortaliças minimamente processadas muitas vezes diferem daqueles

adequados para os mesmos produtos, quando íntegros. Isso se deve ao fato de que os processos fisiológicos e as barreiras naturais para as trocas gasosas, no vegetal, são alterados pelo processamento mínimo. Da mesma forma, o tempo de armazenamento dos produtos minimamente processados pode ser insuficiente para levar ao surgimento dos sintomas de distúrbios. Os vegetais minimamente processados podem tolerar níveis mais extremos de O_2 e CO_2 , pois não apresentam casca para restringir a difusão dos gases e a distância do centro do produto para a superfície externa é menor que no produto inteiro, facilitando a difusão dos gases.

Os tratamentos químicos em produtos minimamente processados são realizados principalmente para reduzir o escurecimento enzimático e/ou manter a firmeza dos tecidos. O ácido ascórbico e seu isômero eritórbico têm sido bastante utilizados em combinação com outros ácidos orgânicos, como ácido cítrico, para reduzir o escurecimento enzimático. O ácido cítrico também pode ser utilizado para reduzir a perda de pigmentação durante as operações de lavagem, sanificação e enxágüe e para reduzir a atividade respiratória.

A utilização de cálcio por meio de soluções aquosas de seus sais, como cloreto de cálcio e lactato de cálcio, tem sido eficiente na prevenção do amaciamento de uma série de frutas. O cálcio é um mineral que se liga às substâncias pecticas, dando origem aos pectatos de cálcio, estruturas que conferem estabilidade à parede celular.

Devido à importância do etileno na fisiologia dos produtos minimamente processados, outros tratamentos químicos têm sido aplicados, como a utilização de embalagens que contêm 1-metilciclopropeno e absorvedores de etileno para retardar a senescência dos produtos.

► Bibliografia

Leitura recomendada: Awad, 1993; Chitarra & Chitarra, 1990; Kluge et al., 2002; Wiley, 1994.

Alves, R.E.; Souza Filho, M.S.M. de.; Bastos, M.S.R.; Filgueiras, H.A.C.; Borges, M.F. Pesquisa em processamento mínimo de frutas no Brasil. In: *Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de*

- Frutas e Hortaliças 2*. Palestras, p. 75-85. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2000.
- Awad, M. *Fisiologia pós-colheita de frutos*. Nobel, São Paulo. 1993.
- Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O.; Baker, R.A. *Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables*. HortScience, 30(1): 35-38. 1995.
- Bobbio, F.O.; Bobbio, P.A. *Introdução à química de alimentos*. 3 ed., Varela, São Paulo. 2003.
- Bobbio, P.A.; Bobbio, F.O. *Química do processamento de alimentos*. 2 ed., Varela, São Paulo. 1992.
- Brecht, J.K. *Physiology of lightly processed fruits and vegetables*. HortScience, 30(1): 18-22. 1995.
- Cantwell, M. *Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables*. In: Kader, A.A. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, p. 277-281. 2 ed., University of California, Davis. 1992.
- Chitarra, M.I.F.; Chitarra, A.B. *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2 ed., Lavras. UFLA, 2005.
- Coultate, T.P. *Manual de química y bioquímica de los alimentos*. 2 ed., Acribia, Zaragoza. 1998.
- Jacomino, A.P.; Arruda, M.C. de.; Moreira, R.C. *Processamento mínimo de frutas no Brasil*. In: *Simpósio Estado Actual del Mercado de Frutos y Vegetales Cortados en Iberoamérica*. Anais, p. 79-86. Costa Rica. 2004.
- Jacomino, A.P.; Arruda, M.C. *Aplicações da atmosfera modificada em produtos minimamente processados*. In: *Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças 3*. Palestras, p. 48-52. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2004.
- Kluge, R.A.; Nachtigal, J.C.; Fachinello, J.C.; Bilhalva, A.B. *Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado*. Livraria e Editora Rural Ltda., Campinas. 2002.
- Mokady, S.; Cogan, U.; Lieberman, L. *Stability of vitamin C in fruit and fruit blends*. Journal Science Food Agricultural, 35: 452-456. 1984.
- Oetiker, J.H.; Yang, S.F. *The role of ethylene in fruit ripening*. Acta Horticulturae, 398: 167-178. 1995.
- Poovaiah, B.W. *Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables*. Food Technology, 16(1): 86-89. 1986.
- Sisler, E.C.; Serek, M. *Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments*. Physiologia Plantarum, 100(3): 577-582. 1997.

- Sisler, E.C.; Yang, S.F. *Ethylene, the gaseous plant hormone*. Bioscience, 34,(4): 234-238. 1984.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. Trad. de Santarém, E.R. et al. 3 ed., Artmed, Porto Alegre. 2004.
- Vitti, M.C.D. *Aspectos fisiológicos, bioquímicos e microbiológicos em beterrabas minimamente processadas*. Dissertação (Mestrado) — Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2003.
- Wang, C.Y. *Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress*. HortScience, 17(2): 173-186. 1982.
- Watada, A.E., Abe, K.; Yamuchi, N. *Physiological activities of partially processed fruits and vegetables*. Food Technology, 44(5): 116, 118, 120-122. 1990.
- Watada, A.E.; Qi, L. *Quality of fresh-cut produce*. Postharvest Biology and Technology, 15: 201-205. 1999.
- Wild, H.P.J.; Woltering, E.J.; Peppelenbos, W. *Carbon dioxide and 1-MCP inhibit ethylene production and respiration of pear fruit by different mechanisms*. Journal of Experimental Botany, 50(335): 837-844. 1999.
- Wiley, R.C. (Ed.). *Minimally processed refrigerated fruits & vegetables*. Chapman & Hall, Nova York. 1994.
- Wills, R.; McGlasson, B.; Graham, D.; Joyce, D. *Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales*. Trad. de. González, J.B. 2 ed., Acribia, Zaragoza. 1998.
- Yang, S.F. *Biosynthesis and action of ethylene*. HortScience, 20(1): 41-45. 1985.

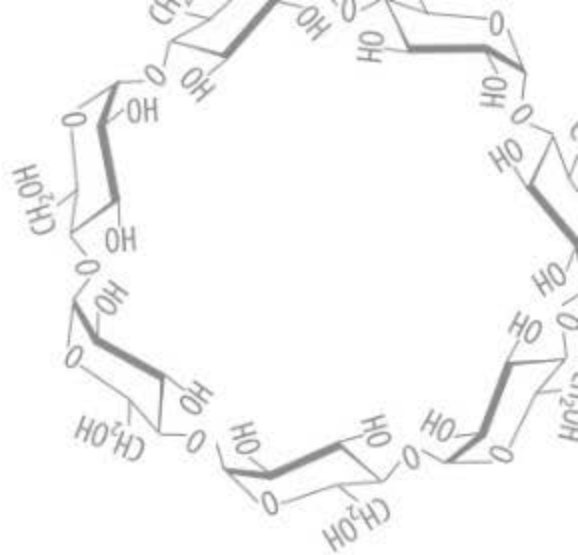


7

Bioquímica da Carne: Bases Científicas e Implicações Tecnológicas

Marco Antonio Trindade
Izael Gressoni Júnior

- Introdução, 192
- Composição, 193
- Mudanças bioquímicas pós-morte no músculo, 217
- Implicações tecnológicas, 222
- Bibliografia, 232



► Introdução

Conhecer a composição, a estrutura e a bioquímica da carne e de seus componentes é de fundamental importância para quem trabalha tanto com esse produto *in natura* quanto com o processamento e a elaboração de embutidos em geral.

A carne é o resultado de diversas transformações físicas, químicas e bioquímicas sofridas pelos músculos após o abate. As transformações que ocorrem nas primeiras 24 h determinam as características e propriedades da carne e são dependentes do manejo pré- e pós-abate.

A carne é o resultado das diversas transformações químicas sofridas pelo músculo após o abate dos animais. O músculo vivo é um tecido altamente especializado, capaz de converter energia química em mecânica durante sua contração. A habilidade de contrair e relaxar, característica do músculo vivo, é perdida quando o músculo é convertido em carne. Entretanto, alguns aspectos do mecanismo de contração e de relaxamento no músculo vivo estão diretamente relacionados ao encurtamento das fibras e à perda da maciez que ocorrem na carne após o abate do animal. As modificações físicas e químicas que ocorrem no músculo nas primeiras 24 h após o abate determinam muitas das características e propriedades da carne. Essas modificações são decorrentes do manejo pré-abate e dos procedimentos de abate e de resfriamento das carcaças. Um bom entendimento de como funciona o músculo vivo facilita a compreensão das várias propriedades pós-morte do músculo como alimento, permitindo desenvolver as técnicas de abate (incluindo o pré- e o pós-abate) que garantam a obtenção de carnes com as melhores propriedades funcionais e sensoriais possíveis.

A habilidade de contrair e relaxar característica do músculo vivo, é perdida quando o músculo é convertido em carne, mas alguns aspectos do mecanismo de contração e relaxamento estão relacionados à perda de maciez da carne após o abate.

Em função do exposto, neste capítulo serão apresentadas as bases científicas da bioquímica da carne, incluindo sua composição química, a estrutura dos tecidos que a compõe, o mecanismo da contração do músculo vivo e suas relações com as modificações que ocorrem após o abate dos animais e que levam à transformação desse músculo em carne. Além disso, serão discutidos os fatores pré- e pós-abate que influenciam as propriedades funcionais e sensoriais da carne e os cuidados que podem ser tomados para se obterem carnes de melhor qualidade.

► Composição

Antes de discutir cada constituinte da carne, devemos localizá-la no contexto mais geral das carcaças, obtidas após o abate dos animais.

► Composição da carcaça

A carcaça animal é o produto do abate de animais domésticos ou selvagens sacrificados com vistas ao aproveitamento da carne como alimento. Assim, por exemplo, pode-se dizer que a carcaça bovina é o corpo do boi abatido, do qual foram removidos a pele, as vísceras, a cabeça, as patas, as gorduras cavitárias e o rabo. Na média, em torno de 50, 55 e 70% do peso vivo de ovinos, bovinos e suínos, respectivamente, permanecem na carcaça.

De um modo geral, pode-se dizer que a carcaça animal é formada de músculos, ossos e gordura, e as proporções em que esses constituintes estão presentes na carcaça exercem grande influência do ponto de vista comercial. À medida que aumentam os teores de gordura e ossos, diminuem proporcionalmente os teores de músculo na carcaça. A composição da carcaça depende, de um modo geral, da composição genética, da idade, da raça, da alimentação e do manejo, bem como das condições ambientais. Independentemente dos fatores genéticos e ambientais, a alimentação contínua e constante durante toda a vida do animal favorece uma maior proporção de carne na carcaça. O peso do tecido muscular (carne) na carcaça varia de 46 a 65% em ovelhas, 49 a 68% em bovinos e 36 a 64% em suínos, em função dos fatores acima citados.

► Composição do músculo e dos tecidos associados

As carnes são compostas por quatro tipos básicos de tecidos: *epitelial*, *nervoso*, *conjuntivo* e *muscular*. As propriedades e as quantidades desses tecidos são responsáveis em grande parte pela qualidade e maciez da carne.

Carcaça é o produto do abate com objetivo de utilizar a carne como alimento. Ela corresponde a 50, 55 e 70% do peso vivo de ovinos, bovinos e suínos e é composta de músculos, ossos e gordura. O tecido muscular corresponde a cerca de 65% da carcaça.

A composição da carcaça depende de fatores genéticos (espécie, raça e indivíduo) de fatores ambientais e do manejo de animais. A alimentação constante e contínua favorece uma maior proporção de carne de carcaça.

As carnes são compostas por tecidos epitelial, nervoso, conjuntivo e muscular. Os tecidos epitelial e nervoso correspondem a uma fração muito pequena das carnes.

Tecido epitelial

Comparativamente aos demais tecidos, o tecido epitelial é encontrado na carne em menor proporção; mas, em alguns casos, como na formação do aroma, sabor e crocância característicos do frango frito, seu papel é fundamental. As funções que ele exerce são as de proteção, secreção, excreção, transporte, absorção e percepção sensorial. O epitélio recobre as superfícies externas e internas do corpo e a maior parte dele é removida no processo de abate; o restante está associado principalmente aos vasos sanguíneos e linfáticos, permanecendo também em órgãos comestíveis, como fígado e rins. O tecido epitelial é formado por células intimamente unidas entre si, justapostas em grande parte de sua superfície e com pouca matriz extracelular. As células epiteliais variam da forma plana ou escamosa à colunar.

Tecido nervoso

O tecido nervoso constitui uma pequena proporção da carne (menos que 1%), mas sua função no período imediatamente anterior e durante o abate pode ter grande influência sobre sua qualidade. O tecido nervoso é parte do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP). O SNC engloba o cérebro e a medula espinal e é constituído de células nervosas (neurônios) e de uma variedade de células de sustentação. O SNP consiste principalmente em fibras nervosas de outras partes do corpo e tem como função manter a comunicação dessas partes com o SNC.

As fibras nervosas, que se entremeiam no tecido muscular para transmitir os impulsos nervosos e receber os estímulos sensoriais, são compostas por grupos de axônios, e a reunião de grupos de fibras nervosas em feixes resulta na formação de troncos nervosos. Nas fibras nervosas, o axônio terminal de um neurônio interdigita-se com os dendritos da célula subsequente. Essa região de contato chama-se sinapse, e nela, devido à grande proximidade, substâncias químicas liberadas por um neurônio podem agir sobre outro (Figura 7.1).

O epitélio recobre as superfícies internas e externas do corpo. A maior parte é removida durante o abate. Em frango frito, o epitélio é fundamental na formação de crocância, do aroma e do sabor.

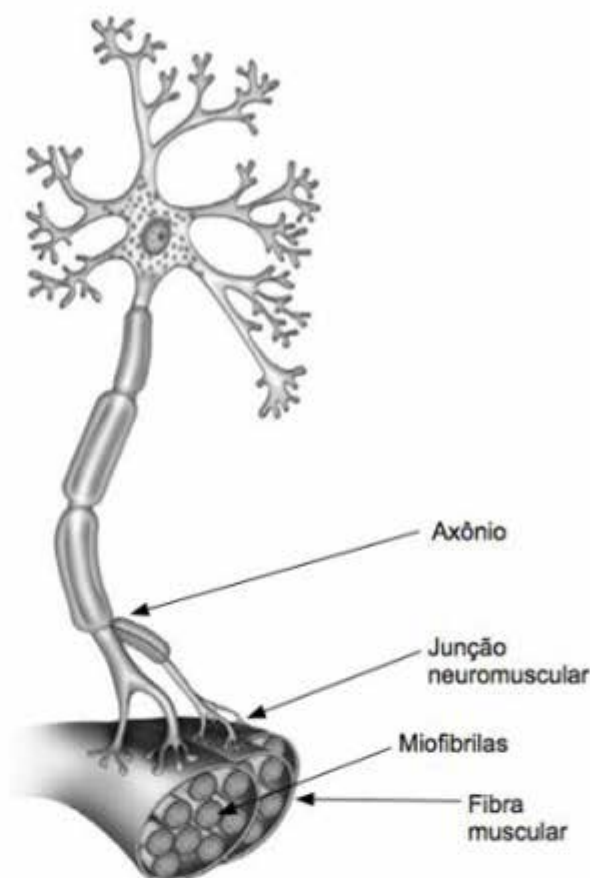


Figura 7.1 Diagrama de um neurônio associado a fibras musculares.

Tecido conjuntivo

Como o próprio nome diz, o tecido conjuntivo literalmente junta e mantém ligadas várias partes do corpo do animal. O tecido conjuntivo está amplamente distribuído por todo o organismo como componente do esqueleto, na estrutura dos órgãos e vasos sanguíneos e linfáticos e nas camadas que envolvem os tendões e músculos. O tecido conjuntivo envolve os músculos, os feixes de fibras e, por fim, as fibras musculares individualmente. Circundando o músculo como um todo, existe uma bainha de tecido conjuntivo conhecido como epimísio, de cuja superfície interna partem septos de tecido conjuntivo para dentro do músculo, envolvendo feixes de fibras musculares, constituindo o perimísio. A partir do perimísio, forma-se uma fina rede de tecido conjuntivo que envolve cada fibra muscular individualmente, o chamado endomísio (Figura 7.2).

▼

O tecido conjuntivo junta e mantém ligadas várias partes do corpo. Esse tecido está amplamente distribuído como parte do esqueleto, órgãos, vasos e músculos.

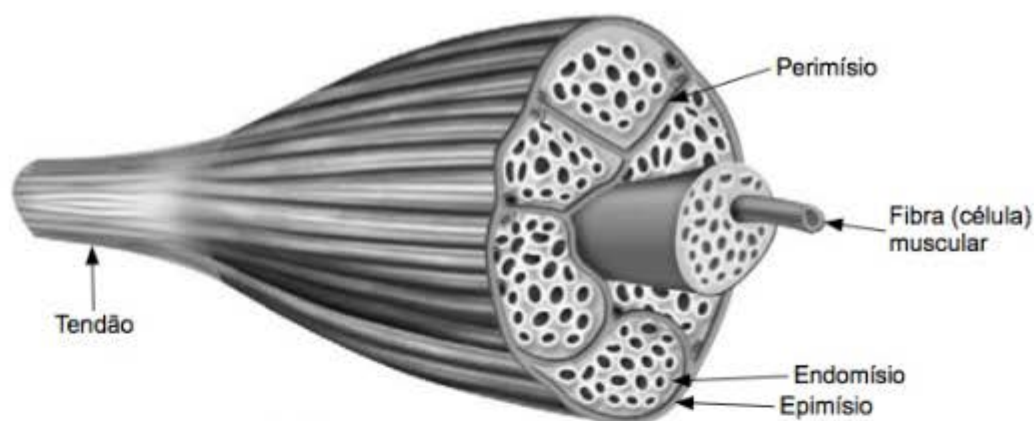


Figura 7.2 Tecido conjuntivo no músculo.

O tecido conjuntivo se caracteriza por apresentar poucas células e muito conteúdo extracelular que varia desde um gel até uma massa fibrosa dura.

Os tecidos conjuntivos são caracterizados geralmente por apresentar poucas células e muito conteúdo extracelular. Essas substâncias extracelulares variam desde um gel mole até uma massa fibrosa muito dura, contendo geralmente fibras que atuam como elementos estruturais. O tecido conjuntivo adiposo é composto principalmente de células com pequena quantidade de fibras extracelulares; já o tecido linfático apresenta fluido extracelular sem fibras. Devido à sua importância sobre as características das carnes, neste capítulo apresentaremos mais detalhadamente apenas o tecido conjuntivo propriamente dito e o tecido conjuntivo adiposo.

O tecido conjuntivo propriamente dito envolve o tecido muscular (endomísio, perimísio e epimísio) e forma os tendões que o ligam aos ossos. Sua matriz extracelular é rica em colágeno, elastina e reticulina, as quais conferem maior rigidez à carne.

Tecido conjuntivo propriamente dito. O tecido conjuntivo propriamente dito inclui elementos com forma (células e fibras extracelulares) e uma substância amorfa basal (substância fundamental) na qual esses elementos estão embebidos. As fibras extracelulares consistem em fibras de colágeno que são retas, inextensíveis e não ramificadas; de elastina, que são elásticas, ramificadas e de cor amarela; e de reticulina. A substância fundamental é uma solução viscosa que contém glicoproteínas solúveis, além de substratos e produtos do metabolismo do tecido conjuntivo, dentre os quais estão o tropocolágeno e a tropoelastina, precursores do colágeno. Entre as glicoproteínas estão o ácido hialurônico e os sulfatos de condroitina. As fibras extracelulares estão dispostas em estruturas compactas que dão origem ao tecido conjun-

tivo denso e, quando formam uma rede de tecido solto, constituem o tecido conjuntivo frouxo.

As *fibras colágenas* são compostas pela proteína colágeno. Esta proteína estrutural do tecido conjuntivo é a mais abundante do organismo animal, chegando à proporção de 20 a 25% da proteína total dos mamíferos, influenciando muito na maciez da carne. O colágeno existe em grande quantidade nos tendões e nos ligamentos e há fibras de colágeno em todos os tecidos e órgãos, incluindo os músculos, onde sua distribuição não é uniforme e guarda certa relação com a atividade física. Ou seja, a musculatura das extremidades contém mais colágeno que a do dorso e, conseqüentemente, a primeira é mais dura que a última. O colágeno é caracterizado pelo alto conteúdo dos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina e completa ausência de aminoácidos sulfurados e triptofano. A glicina representa cerca de um terço do conteúdo total de aminoácidos e a prolina e a hidroxiprolina outra terça parte. Como a hidroxiprolina não aparece em quantidades significativas em outras proteínas e tem uma porcentagem constante no colágeno, o seu teor é normalmente utilizado para determinar o conteúdo de colágeno nos tecidos. A unidade estrutural fundamental do colágeno é o tropocolágeno, que é composto por três cadeias espiraladas, formando uma estrutura em tripla hélice (Figura 7.3). As fibras de colágeno são praticamente inextensíveis e individualmente são incolores, porém, quando formam agregados, apresentam a cor branca que caracteriza os tendões. As moléculas de colágeno apresentam ligações cruzadas entre si, o que se relaciona com sua insolubilidade e resistência à tensão. A quantidade dessas ligações cruzadas e sua estabilidade aumentam com a idade do animal, desse modo os animais jovens possuem um colágeno que se rompe mais facilmente e é também mais solúvel. O aquecimento prolongado em água fervente converte o colágeno em proteínas solúveis, denominadas gelatinas.

O colágeno, proteína estrutural do tecido conjuntivo, é a mais abundante do organismo animal. Nos músculos sua distribuição não é uniforme e guarda certa relação com a atividade física.

O conteúdo de hidroxiprolina é normalmente utilizado para determinar o teor de colágeno dos tecidos.

As fibras de colágeno são praticamente inextensíveis. As moléculas de colágeno formam ligações cruzadas entre si que aumentam com a idade do animal. As ligações cruzadas promovem maior insolubilidade e resistência à tensão.

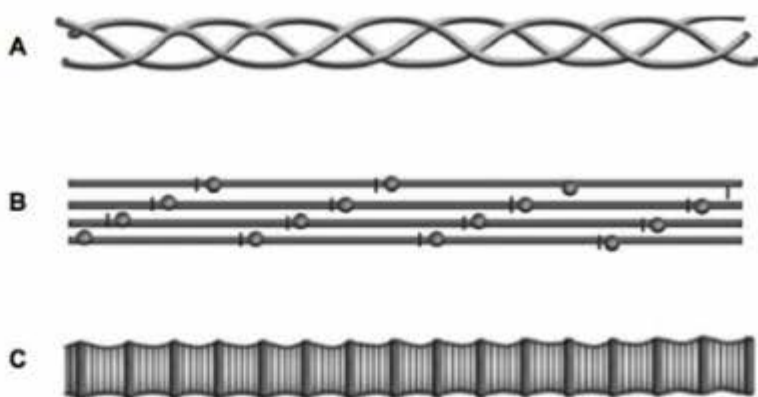


Figura 7.3 Esquema da estrutura do tropocolágeno e da fibrila de colágeno. (A) Estrutura de tripla hélice. (B) Moléculas de tropocolágeno. (C) Fibrila de colágeno.

As *fibras elásticas* são constituídas de uma proteína fina e resistente, a elastina. Apresentam uma cor amarelada, diferindo do colágeno e das reticulares em sua constituição química e em suas propriedades. Elas estão presentes nos ligamentos, paredes das artérias e envolvem vários órgãos, inclusive os músculos. As fibras de elastina são elásticas, distendendo-se com facilidade e voltando ao comprimento normal quando a tensão deixa de existir. A contribuição da elastina para a dureza da carne é significativa, apesar de representar apenas 0,5% do total do tecido conjuntivo contido nos músculos. A elastina é constituída principalmente por glicina e prolina e apresenta alguns aminoácidos incomuns, como a desmosina e a isodesmosina. A extraordinária insolubilidade da elastina deve-se, principalmente, ao seu grande conteúdo de aminoácidos não-polares e às ligações laterais de desmosina. Além disso, a elastina é muito resistente às enzimas digestivas, de modo que sua contribuição para o valor nutritivo da carne é praticamente nula.

As *fibras reticulares* formam delicadas redes que circundam células e dão suporte ao epitélio dos vasos sanguíneos, às estruturas neurais e à membrana da fibra muscular. Elas constituem ainda o tecido fibroso de apoio dos órgãos linfóides e hematopoéticos (baço, medula óssea, linfonodos e amígdalas).

A elastina é extraordinariamente insolúvel em água fazendo com que essa proteína contribua de forma significativa para a resistência da carne apesar de se apresentar em concentrações bem pequenas.

▼

O tecido conjuntivo adiposo é formado por adipócitos que armazenam lipídios neutros e se acumula próximo ao tecido conjuntivo propriamente dito.

Tecido conjuntivo adiposo. O tecido adiposo constitui um tipo especial de tecido conjuntivo com predominância de células adiposas (adipócitos) que armazenam gorduras neutras (triacilgliceróis). As células adiposas organizam-se em grupos, formando lóbulos, que são separados entre si por meio de septos de tecido conjuntivo, que os sustentam. Esse estroma de tecido conjuntivo permite a condução de vasos sanguíneos e nervos para o interior do tecido adiposo. O tecido adiposo exerce diversas funções, como reserva de energia, modelação do corpo, preenchimento de espaços entre tecidos e isolamento térmico do organismo. A capacidade de armazenamento de gordura chega a ser ilimitada em algumas espécies, sendo seu acúmulo em função da alimentação, do sexo e da idade do animal. A coloração desse tecido varia do branco ao amarelo, dependendo da alimentação. A coloração amarela é obtida principalmente pelo acúmulo de carotenóides dissolvidos.

Tecido muscular

▼

O tecido muscular pode ser esquelético estriado, liso ou cardíaco. De 30 a 40% do peso vivo dos animais consiste em tecido muscular esquelético, dividido em cerca de 300 unidades anatomicamente distintas.

O tecido muscular é dividido em esquelético, liso ou involuntário e cardíaco. Na média, 30 a 40% do peso vivo dos animais consistem em *tecido muscular esquelético*. A musculatura de ovinos, bovinos e suínos consiste em cerca de 300 unidades distintas anatomicamente. Esses músculos são altamente diferenciados entre si, podendo diferir em tamanho, forma, tipo de ligação (aos ossos, cartilagens ou ligamentos) suprimento nervoso e sanguíneo, associação com outros tecidos e ação (que pode ser lenta ou rápida, prolongada ou intermitente, simples ou em associação complexa com outros músculos). Esses três tipos de músculos podem ser classificados quanto ao tipo de controle efetuado pelo sistema nervoso central, agindo o músculo esquelético sob controle voluntário e os músculos liso e cardíaco sob controle involuntário. Os músculos esquelético e cardíaco são também chamados de estriados por apresentarem bandas claras e escuras quando observados ao microscópio, enquanto o músculo liso não apresenta essa característica (Figura 7.4).

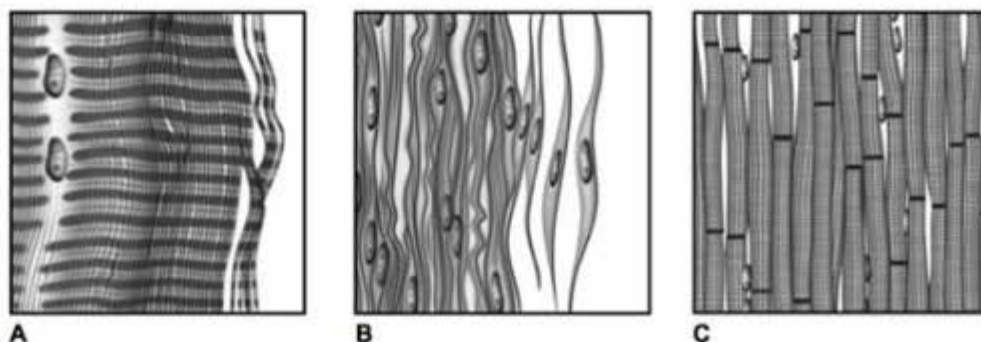


Figura 7.4 Os três tipos de tecido muscular. (A) Músculo esquelético. (B) Músculo liso. (C) Músculo cardíaco.

■ Tecido muscular esquelético estriado

O *tecido muscular esquelético* é composto por células altamente especializadas, longas, cilíndricas e multinucleadas, as fibras musculares, que possuem de 1 mm até mais de 30 cm de comprimento e de 10 a 100 μm de diâmetro. Cerca de 75 a 92% do volume total do tecido muscular é constituído pelas fibras musculares, e o volume restante é constituído por matriz extracelular, tecido conjuntivo, fibras nervosas e vasos sanguíneos. Embora existam diferenças nas fibras musculares no que diz respeito à quantidade de sarcoplasma (fluido celular) e na quantidade e localização dos componentes da membrana celular, existe uma grande similaridade, no nível celular, do músculo esquelético de uma grande variedade de organismos.

No músculo, as fibras são agrupadas paralelamente, formando feixes de fibras ou fascículos e os feixes estão associados de vários modos para formar os diversos tipos de músculos. As fibras musculares individuais, os feixes e o músculo são recobertos por tecido conjuntivo que forma uma rede contínua, mas que recebe diferentes nomes de acordo com sua localização (epimísio, perimísio e endomísio), conforme indicado anteriormente (Figura 7.2). As fibras nervosas e os vasos sanguíneos que irrigam o músculo esquelético acompanham os septos de tecido conjuntivo a partir do epimísio e vão-se ramificando até atingir cada fibra muscular. As arteríolas e as vênulas são orientadas transversalmente em relação às fibras musculares e a maioria dos capilares é arranjada paralelamente

O tecido muscular esquelético é composto por células altamente especializadas, longas e cilíndricas que correspondem a de 75 a 92% do tecido. O volume restante é constituído por matriz extracelular, tecido conjuntivo, fibras nervosas e vasos sanguíneos.

▼

A célula (ou fibra) muscular é multinucleada e delimitada pelo sarcolema, que sofre invaginações formando os *túbulos T*, que distribuem os impulsos nervosos.

ao eixo longitudinal das fibras. Esse tipo de estrutura permite uma ampla cobertura da superfície da célula para a troca de nutrientes e produtos do metabolismo celular. Cada fibra nervosa pode-se ramificar e inervar inúmeras fibras musculares. O contato entre os axônios terminais e as fibras musculares acontece através das placas motoras terminais. A gordura intramuscular, que proporciona a marmorização da carne é depositada junto ao perimísio, próxima aos vasos sanguíneos, enquanto a gordura intermuscular deposita-se junto ao epimísio. Em ambos os casos, a quantidade de gordura depositada pode variar muito, de acordo com a idade e o estado nutricional do animal.

Sarcolema. A membrana lipoprotéica que recobre cada fibra muscular não difere essencialmente das membranas plasmáticas de outros tipos celulares, mas recebe o nome de sarcolema. Ela apresenta grande elasticidade para suportar as distorções que ocorrem nas fases de contração, relaxamento e estiramento do músculo. Uma característica exclusiva do sarcolema é a formação de invaginações ao longo de toda a superfície da fibra, formando uma rede de túbulos, chamados de *túbulos transversais* ou *túbulos T*.

A fibra muscular é composta principalmente por miofibrilas. As miofibrilas são separadas por uma delicada rede de túbulos, o retículo sarcoplasmático, que está posicionado paralelamente em relação às miofibrilas. Dentro de cada fibra existe um líquido matriz chamado de sarcoplasma, que contém mitocôndrias, enzimas, glicogênio, adenosina-trifosfato (ATP), creatina e mioglobina. Um outro sistema de túbulos, chamado de túbulos transversos, posiciona-se perpendicularmente às miofibrilas. As miofibrilas são compostas por pequenas unidades chamadas de sarcômeros, que são constituídos por filamentos finos e grossos que interagem entre si (Figura 7.5).

Sarcoplasma. O sarcoplasma de uma fibra muscular corresponde ao citoplasma de outras células e pode ser

▼

O sarcoplasma é o líquido matriz no qual estão dispersas as organelas e as miofibrilas. Entre as organelas mais importantes estão as mitocôndrias, responsáveis pelo metabolismo energético aeróbico.

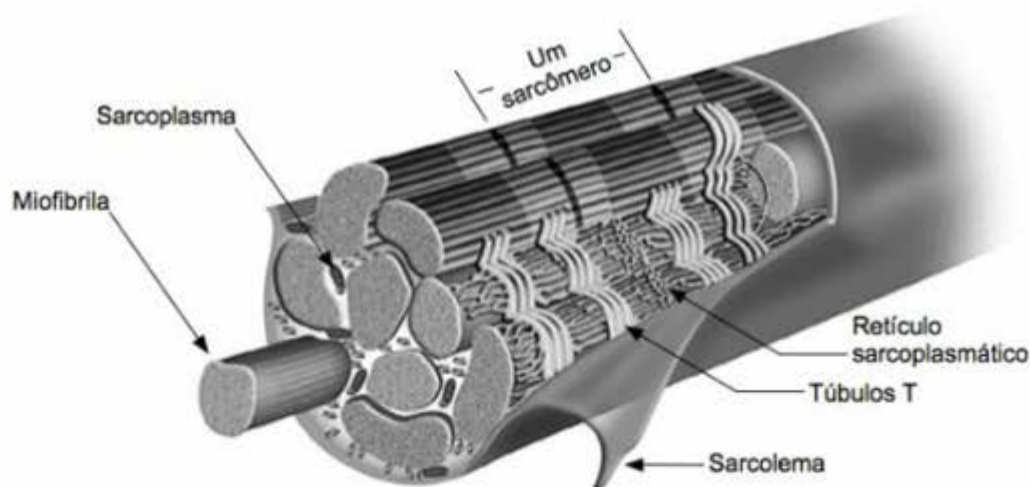


Figura 7.5 Representação do retículo sarcoplasmático e dos túbulos T e de sua relação com as miofibrilas.

definido como o líquido matriz do sarcolema, excluindo os núcleos. É constituído de 75 a 85% de água, gotículas de gordura e grânulos de glicogênio, e de organelas, assim como de miofibrilas peculiares ao músculo.

Núcleos. A quantidade de núcleos de uma fibra muscular esquelética varia de acordo com o seu comprimento; em uma fibra com vários centímetros de comprimento, pode haver centenas de núcleos. Os núcleos são alongados na direção da fibra e normalmente localizam-se logo abaixo do sarcolema, exceto nas fibras musculares esqueléticas de peixes onde localizam-se no centro.

Miofibrilas e miofilamentos. As miofibrilas são estruturas cilíndricas, compridas e delgadas, com diâmetro de 1 a 2 μm , orientadas no sentido longitudinal da fibra muscular e preenchendo completamente seu interior. Uma fibra muscular de um diâmetro de 50 μm pode ter de 1.000 até 2.000 miofibrilas. As miofibrilas são formadas por um agrupamento ordenado de filamentos grossos e finos paralelos entre si, cuja distribuição ao longo da miofibrila é responsável pela formação de bandas. As miofibrilas, por sua vez, também se agrupam de modo que as bandas ou estrias fiquem em sincronia, formando faixas claras e escuras que caracterizam o músculo estriado esquelético. Quando observadas sob luz polarizada

A maior parte da fibra muscular é preenchida pelas miofibrilas, formadas por filamentos finos (actina) e grossos (miosina) organizados em sarcômeros, formando bandas ou estrias visíveis ao microscópio.

▼

Sarcômero é o nome dado à unidade estrutural repetitiva da miofibrila onde ocorre o ciclo de contração e relaxamento do músculo e que é definida como o segmento entre duas linhas Z sucessivas.

em microscópio, as bandas escuras são birrefringentes ou anisotrópicas e, por essa razão, receberam o nome de bandas A, e as faixas claras, por serem menos anisotrópicas, receberam o nome de bandas I (elas não são puramente isotrópicas, como sugere a letra I). A banda I é dividida ao meio por uma linha transversal escura, chamada de linha Z. A unidade estrutural repetitiva da miofibrila onde ocorre o ciclo de contração e de relaxamento do músculo é o sarcômero, que é definido como o segmento entre duas linhas Z sucessivas. Dessa forma, um sarcômero inclui uma banda A e duas metades de bandas I. Os comprimentos do sarcômero e da banda I variam de acordo com o estado de contração do músculo, enquanto a banda A permanece sempre constante. Nos músculos em repouso de mamíferos, o sarcômero tem aproximadamente 2,5 μm de comprimento. No centro da banda A, existe uma zona mais pálida, chamada de zona H, que, por sua vez, é atravessada por uma estreita linha escura chamada de linha M (Figura 7.6). A linha M localiza-se exatamente no centro da banda A. Além disso, em cada lado da linha M, dentro da zona H, existe uma região um pouco mais clara que é denominada pseudozona H.

A existência de bandas e zonas ocorre em função do arranjo dos filamentos grossos e finos no interior da miofibrila, e o conhecimento de suas funções é importante para entender os fenômenos que ocorrem no músculo.

Os filamentos grossos, que possuem 10 nm de diâmetro e 1,5 μm de comprimento, são os principais constituintes da banda A e determinam seu comprimento. Esses filamentos são compostos quase exclusivamente da proteína miosina e, por essa razão, são também chamados de filamentos de miosina. Esses filamentos ficam estruturados por conexões transversais delgadas, que se localizam no centro da banda A, formando a linha M.

Os filamentos finos são compostos basicamente da proteína actina. Possuem 5 nm de espessura e estendem-se por cerca de 1 μm em cada direção a partir da linha Z, constituindo a banda I. Na linha Z, cada filamento de

▼

Os filamentos grossos ou filamentos de miosina são os principais constituintes da banda A.

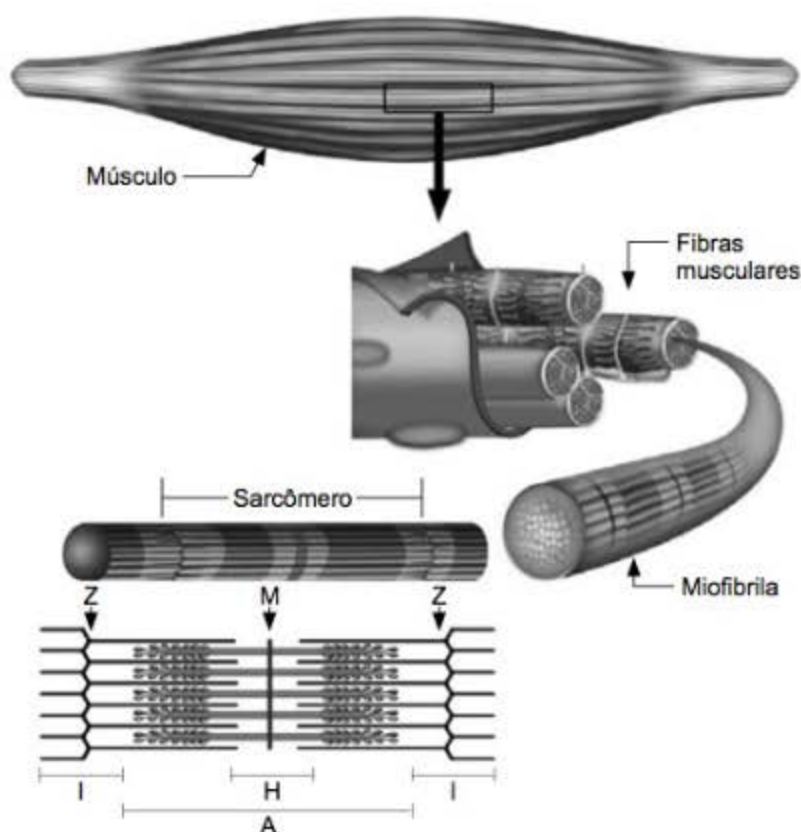


Figura 7.6 Esquema da estrutura do músculo esquelético.

Os filamentos finos, principais constituintes da banda I são compostos principalmente de actina.

actina é contínuo com quatro delgados filamentos divergentes que correm obliquamente através da linha Z para um dos filamentos de actina do outro lado, formando um padrão característico em ziguezague (Figura 7.7). Os filamentos de actina penetram a banda A onde se interdigitam com os filamentos de miosina, de modo que, em cortes transversais na extremidade da banda A, pode-se observar um arranjo ordenado no qual seis filamentos de actina estão regularmente espaçados ao redor de um filamento de miosina. O grau de penetração dos filamentos de actina na banda A varia com o estado de contração muscular. A distância entre as extremidades de dois filamentos opostos de actina determina a largura da faixa H, que é definida como a região da banda A que não é penetrada por filamentos de actina. Nas miofibrilas distendidas, a faixa H é, desse modo, larga, enquanto no estado contraído, ela é muito estreita ou inteiramente ausente. A distância entre os filamentos grossos e finos na região de interdigitação é de apenas 10 a 22 nm e

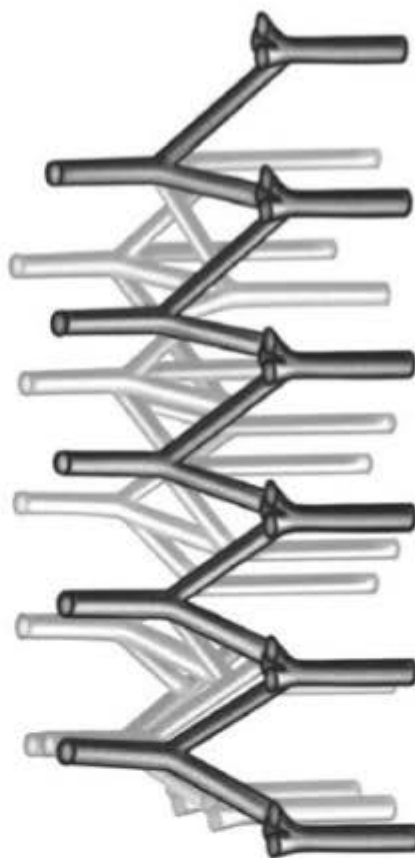


Figura 7.7 Diagrama esquemático da linha Z.

esse estreito espaço é atravessado por pontes transversais regularmente espaçadas que se estendem radialmente de cada filamento de miosina para os filamentos de actina vizinhos.

Retículo sarcoplasmático e túbulos T. O conjunto de retículo sarcoplasmático e túbulos T forma um sistema de canais e cisternas, delimitado por membranas, que se estende por todo o sarcoplasma e forma uma rede ao redor de cada miofibrila, exibindo um padrão repetitivo e altamente especializado que apresenta uma relação constante com determinadas faixas de miofibrila. As membranas reticulares do retículo sarcoplasmático são os locais de armazenamento do cálcio das fibras em repouso. Embora desempenhem funções em conjunto, essas duas estruturas originam-se de sistemas de membranas distintos, uma vez que o retículo sarcoplasmático corresponde ao retículo endoplasmático de outros tipos celulares, enquanto os

▼

O conjunto de retículo sarcoplasmático e túbulos T forma um sistema de canais e cisternas que se estende, como uma rede, ao redor das miofibrilas. O retículo sarcoplasmático controla os níveis de cálcio do sarcoplasma e os túbulos T são responsáveis pela distribuição do impulso nervoso.

túbulos T originam-se do sarcolema e comunicam-se com o espaço extracelular.

Lisossomos. Os lisossomos são pequenas vesículas que atuam como local de reserva de diversas enzimas digestivas. Entre as enzimas proteolíticas lisossomais, as catepsinas são um grupo muito importante, pois agem sobre algumas proteínas musculares, contribuindo para o amaciamento da carne durante a maturação.

Mitocôndrias. Nas fibras musculares esqueléticas, as mitocôndrias são mais abundantes quando próximas aos pólos dos núcleos e imediatamente abaixo do sarcolema, mas também ocorrem no interior da fibra, principalmente ao lado das linhas Z e na união das bandas A e I. Devido às altas exigências energéticas necessárias à contração muscular, as mitocôndrias apresentam numerosas cristas estreitamente espaçadas. Sua associação íntima com os elementos contráteis situa a fonte de energia química (ATP) próxima aos locais de sua utilização nas miofibrilas.

Complexo de Golgi. O complexo de Golgi é formado por um conjunto de vesículas planas, de constituição semelhante à da membrana do retículo sarcoplasmático, que se localiza próximo a um pólo de cada núcleo, por toda a fibra muscular. Sua função principal é concentrar e armazenar os produtos do metabolismo celular.

■ Tecido muscular liso

O tecido muscular liso está presente nas paredes do trato digestivo e das vias respiratórias, nos ductos urinários e genitais, nas paredes das artérias, veias e grandes vasos linfáticos e na pele, representando, no entanto, apenas uma pequena parte das carnes. A fibra muscular lisa varia em tamanho e forma, conforme a localização do tecido. Possui somente um núcleo, geralmente central e o retículo sarcoplasmático é bem menos desenvolvido em relação à musculatura esquelética. Os miofilamentos são menos ordenados do que no músculo esquelético, ordenando-se aos pares e paralelamente ao eixo longitudinal da fibra. Actina e miosina existem na mesma proporção

Os lisossomos e o complexo de Golgi são compostos por vesículas. Nos lisossomos são armazenadas enzimas como as proteases catepsinas. O complexo de Golgi concentra e armazena produtos do metabolismo celular.

O tecido muscular liso é composto de células uninucleadas isoladas ou em pequenos feixes circundados por tecido conjuntivo. Possui a mesma proporção de actina e miosina que o tecido esquelético, mas estas não formam estrias.

O tecido muscular cardíaco apresenta algumas propriedades do músculo liso e outras do músculo estriado resultando em sua capacidade de contração rítmica, involuntária e ininterrupta.

que no músculo esquelético, mas não formam estrias, por isso a nomenclatura músculo liso. As células musculares lisas podem apresentar-se isoladas ou em pequenos grupos, formando feixes. Em qualquer um dos casos, são envolvidas por tecido conjuntivo que as mantém unidas e que transmite a força de contração uniformemente. Os espaços entre as fibras do músculo liso são preenchidos por tecido conjuntivo, fibras nervosas e vasos sanguíneos, no entanto as fibras do músculo liso são menos irrigadas do que as do músculo esquelético.

■ Tecido muscular cardíaco

O músculo cardíaco apresenta algumas propriedades que lembram o músculo liso e outras que lembram o esquelético. O resultado disso é sua propriedade exclusiva de contratilidade rítmica, que continua ininterruptamente desde o início da vida embrionária até a morte. O miocárdio é a camada contrátil do coração que forma a maior parte do músculo cardíaco. A distribuição do tecido conjuntivo, dos vasos sanguíneos e linfáticos e das fibras nervosas não difere da relatada para os outros tipos de músculos, exceto por apresentar uma extensa rede de capilares sanguíneos, o que se relaciona com sua grande capacidade para o metabolismo oxidativo juntamente com a presença de sarcoplasma mais abundante e rico em glicogênio e mitocôndrias maiores e mais numerosas. Os miofilamentos agregam-se, formando fibrilas que variam muito em tamanho, dependendo de sua localização ao longo do eixo longitudinal da fibra, mas os filamentos de actina e de miosina ainda se alinham, resultando em uma aparência estriada muito semelhante à do músculo esquelético.

► Composição química da carne

O músculo esquelético é o principal constituinte da carne e é composto por água, proteínas, gorduras, carboidratos e constituintes inorgânicos. Aproximadamente 75% (de 65 a 80%) do peso do músculo é água. A água é o principal constituinte dos fluidos extracelulares e vários componentes químicos estão dissolvidos ou sus-

O músculo é formado por 75% de água, 15 a 20% de proteínas, até 1,5% de glicogênio e cerca de 1% de minerais. O conteúdo lipídico é o mais variável, podendo estar entre 1,5 e 13%.

pensos nela. Em função disso, ela age como meio de transporte de substâncias entre a rede vascular e as fibras musculares.

As proteínas correspondem de 16 a 22% da massa muscular. As proteínas do músculo podem ser divididas em três classes: sarcoplasmáticas, miofibrilares e estromáticas. As proteínas sarcoplasmáticas representam 30 a 35% do total de proteínas no músculo esquelético e incluem a mioglobina (proteína responsável pela respiração do tecido muscular e pela coloração vermelha das carnes) e as enzimas do metabolismo muscular. A fração miofibrilar é constituída das proteínas responsáveis pela contração muscular e perfazem 52 a 56% de toda a proteína muscular. Por fim, são classificadas como proteínas estromáticas, ou do estroma, aquelas insolúveis em solventes aquosos e que representam 10 a 15% das proteínas da musculatura esquelética. O colágeno representa 40 a 60% das proteínas do estroma e a elastina, de 10 a 20% do total dessa fração.

Além das proteínas, outros compostos nitrogenados estão presentes no músculo. Entre eles, as substâncias nitrogenadas não protéicas (1,5%), que incluem vários compostos químicos, como, por exemplo, aminoácidos, peptídios simples, creatina, creatinina, algumas vitaminas, nucleosídeos e nucleotídeos, incluindo a adenosina-trifosfato (ATP). O conteúdo de lipídios no músculo é extremamente variável, abrangendo a faixa de aproximadamente 1,5 até 13%, constituindo-se praticamente de lipídios neutros (triacilgliceróis) e fosfolipídios. Quanto aos carboidratos, o conteúdo dessa classe de componentes no músculo é geralmente muito pequeno. O glicogênio, que é o carboidrato mais abundante no músculo varia de 0,5 a 1,3% em relação ao peso muscular. Finalmente, o músculo contém vários constituintes inorgânicos (1,0%); entre eles, cátions e ânions de importância fisiológica, como cálcio, magnésio, potássio, sódio, ferro, fósforo, enxofre e cloro. Vários outros constituintes inorgânicos encontrados no organismo animal também estão presentes no músculo.

As proteínas do músculo podem ser divididas em sarcoplasmáticas (30%), miofibrilares (55%) e do estroma (15%), sendo seus representantes mais importantes a mioglobina, a miosina e o colágeno, respectivamente.

Dentre os constituintes inorgânicos do músculo estão cátion e ânions de importância fisiológica: cálcio, potássio e sódio, entre outros.

Proteínas dos miofilamentos

As proteínas miosina e actina constituem 75 a 80% das proteínas miofibrilares, sendo a porção restante constituída pelas proteínas reguladoras da função muscular, atuando direta ou indiretamente no complexo adenosina-trifosfato-actina-miosina. As principais proteínas reguladoras, em ordem decrescente de concentração na miofibrila, são: tropomiosina, troponina, proteínas da linha M (creatinoquinase, miomesina e proteína M), α -actinina, proteína C e β -actinina.

A *actina* constitui de 20 a 25% das proteínas miofibrilares. Ela é composta por subunidades globulares de actina G, que se polimerizam, formando unidades de uma proteína fibrilar (actina F), que, por sua vez, entrelaçam-se duas a duas em hélice — forma característica do filamento de actina (Figura 7.8). A actina é rica em prolina e seu ponto isoelétrico é de aproximadamente 4,7. Os filamentos de actina formam a estrutura básica dos filamentos finos.

A *tropomiosina* e a *troponina* representam, juntas, de 16 a 20% das proteínas miofibrilares. A tropomiosina é um dímero helicoidal, que se une cabeça à cauda, formando um cordão. A troponina é um trímero que se liga a um local específico em cada dímero de tropomiosina. A tropomiosina é responsável pela sensibilidade do sistema actomiosina ao cálcio que deflagra a contração, e a troponina é a proteína receptora deste íon. Ambas

Actina e miosina correspondem a 80% das proteínas miofibrilares, e os 20% restantes são formados por proteínas reguladoras da contração muscular.

A actina corresponde a 25% das proteínas. É formada por unidades globulares (actina G) que se polimerizam, formando os filamento finos (actina F).

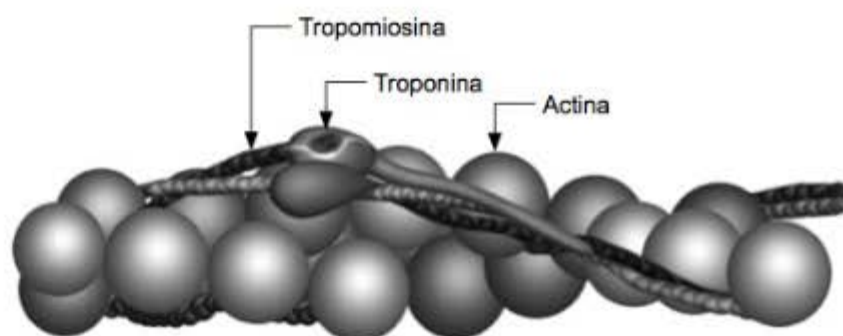


Figura 7.8 Estrutura de um filamento fino e de seus componentes.

Tropomiosina e troponina são as principais proteínas reguladoras (sensíveis ao cálcio).

A miosina constitui 55% das proteínas. Tem a forma de um bastão com uma projeção globular (cabeça de miosina) e se coloca cauda a cauda para formar os filamentos grossos. As cabeças de miosina apresentam atividade ATPásica e são capazes de se ligar à actina durante a contração muscular.

estão associadas ao filamento de actina. A tropomiosina tem uma estrutura fibrilar, composta por duas cadeias polipeptídicas enroladas, e posiciona-se sobre um sulco da superfície da actina, estendendo-se por 7 unidades de actina G. A troponina é formada por três subunidades polipeptídicas: TnT (possui afinidade com a tropomiosina), TnI (possui afinidade com a actina e inibe a ação da ATPase) e TnC (liga-se ao Ca^{2+}); distribui-se a intervalos regulares em locais específicos da tropomiosina.

A *miosina* constitui de 50 a 55% da proteína miofibrilar e se caracteriza por sua grande proporção de aminoácidos carregados positiva ou negativamente. Seu pH isoelétrico é de 5,4. A molécula de miosina tem a forma de um bastão com cerca de 150 nm de comprimento, com uma projeção globular dupla (chamada de cabeça da miosina) em uma das extremidades. Os filamentos de miosina são formados por um arranjo antiparalelo de moléculas de miosina, de tal modo que a porção central é lisa e formada apenas pela região em bastão das moléculas (a porção central corresponde à pseudozona H, localizada no centro da banda A e mencionada anteriormente), com as cabeças globulares projetando-se para fora, próximas às extremidades das fibrilas (Figura 7.9). A miosina pode ser quebrada pela ação proteolítica da tripsina, o que origina dois fragmentos chamados de meromiosina leve (MML) e meromiosina pesada (MMP); essa última contém a cabeça da miosina. As moléculas de miosina associam-se cauda a cauda para formar o filamento grosso bipolar.

Durante a contração muscular, as cabeças de miosina formam pontes com os filamentos de actina, originando um complexo químico conhecido como actomiosina. Esse mecanismo será discutido a seguir.

■ Mecanismo de contração muscular

Para que se possa compreender as alterações bioquímicas que ocorrem no músculo após o abate, é necessário conhecer o mecanismo de contração muscular. A contração muscular inicia-se a partir de um estímulo nervoso

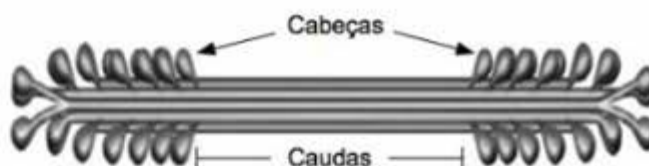


Figura 7.9 Estrutura de um filamento grosso.

No músculo esquelético a contração é iniciada a partir de um estímulo nervoso.

A diferença de potencial elétrico entre o interior e o exterior da célula é mantida pela bomba de sódio e potássio, cuja a energia é fornecida pela hidrólise de ATP.

no sarcolema. No músculo esquelético, a contração é normalmente iniciada a partir de um estímulo nervoso no cérebro ou na medula espinal, que é transmitido ao músculo por meio de um nervo. As fibras nervosas que transmitem o estímulo contráctil aos músculos esqueléticos são denominadas nervos motores. Nas células vivas, sob condições normais de repouso, sempre existe diferença de potencial elétrico entre o interior e o exterior da célula. Um dos fatores que causam essa diferença de potencial são as altas concentrações de íons sódio e cloro e concentrações muito baixas de íons potássio e de íons negativos não difusíveis no fluido extracelular, enquanto o fluido intracelular contém concentrações muito altas de íons potássio e de íons negativos não-difusíveis e concentrações relativamente baixas de íons sódio e cloro. Os gradientes de concentração de íons sódio e potássio são mantidos por transporte ativo, através da membrana, sendo o de sódio do exterior para o interior da célula e o de potássio, do interior para o exterior da célula. Esse sistema é conhecido como bomba de sódio-potássio. A energia requerida para bombear os íons é fornecida pela hidrólise do ATP (adenosina-trifosfato). A permeabilidade da membrana plasmática à difusão de íons potássio é 50 a 100 vezes maior do que sua permeabilidade à difusão de íons sódio. Portanto, os íons potássio difundem-se para fora da célula muito mais rapidamente do que os íons sódio penetram o interior da célula. Mas a difusão de cargas positivas não continua indefinidamente. Quando o potencial da membrana é estabelecido, ele impede o fluxo de íons potássio para fora da célula, de modo que um equilíbrio seja atingido.

O estímulo (potencial de ação) que inicia a contração muscular é transferido da fibra nervosa para a fibra muscular na junção neuromuscular.

As fibras musculares são capazes de transmitir um impulso elétrico chamado de *potencial de ação* através das superfícies de suas membranas. Quando um potencial de ação é transferido de um nervo motor para uma fibra muscular, inicia-se a contração muscular. O estímulo (potencial de ação) que inicia a contração muscular é transferido da fibra nervosa para a fibra muscular na junção neuromuscular. O potencial de ação inicia-se na junção neuromuscular e avança longitudinalmente, em ambas as direções, ao longo do sarcolema, estimulando toda a fibra. Ele é transmitido para cada miofibrila no interior da fibra através dos túbulos T e é transferido ao retículo sarcoplasmático que envolve cada miofibrila.

Contração do músculo esquelético. A contração muscular pode ser resumidamente definida como sendo a formação do complexo actomiosina. A contração do músculo esquelético envolve diretamente quatro proteínas miofibrilares: actina, miosina, tropomiosina e troponina. As duas primeiras são proteínas contráteis. A tropomiosina e a troponina são proteínas reguladoras, que regem o mecanismo da contração, “ligando” e “desligando” o processo.

Para que o músculo permaneça em repouso é necessário manter uma concentração relativamente alta de ATP, cuja a maior parte se encontra na forma de um complexo que inibe a interação da actina com a miosina, impedindo a contração.

No estado de repouso, o músculo gera uma tensão mínima e permanece extensível. Isso significa que não existem pontes entre os filamentos de actina e miosina. Já no *rigor mortis* formam-se pontes permanentes entre esses filamentos, e o músculo torna-se inextensível. O músculo em repouso apresenta um teor muito baixo de íons cálcio no fluido sarcoplasmático que circunda as miofibrilas. Entretanto, o teor total de íons cálcio no músculo esquelético é superior a esse nível em mil vezes, estando praticamente todo o cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático. Para que o músculo permaneça em repouso, é necessário manter uma concentração relativamente alta de ATP. A maior parte de ATP no músculo é encontrado na forma de um complexo com o íon magnésio. Esse complexo inibe a interação das duas proteínas, actina e miosina, impedindo a contração.

▼

A contração muscular acontece quando há formação do complexo actomiosina e encurtamento dos sarcômeros. Ela se inicia por um impulso elétrico transmitido através dos túbulos T que provoca a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático.

▼

Simultaneamente há alterações na conformação da actina (mediadas pela ação da troponina e da tropomiosina), que permitem sua ligação à miosina, e há hidrólise de ATP pelas cabeças de miosina. Os filamentos de actina e miosina fazem ligações cíclicas que provocam o encurtamento do sarcômero, formando o complexo actomiosina.

Quando a concentração de cálcio no sarcoplasma é baixa e a concentração do complexo magnésio-ATP é alta, a troponina e a tropomiosina inibem a formação de pontes entre os filamentos de actina e miosina. O fenômeno da contração inicia-se com a chegada de um impulso nervoso na junção entre o nervo e o músculo. A membrana externa torna-se despolarizada e essa despolarização é transmitida ao interior da fibra muscular através dos túbulos T. Esses túbulos T encontram-se perto do retículo sarcoplasmático que é um depósito de íons cálcio. Essa despolarização provoca a liberação de cálcio, que é o regulador fisiológico da contração muscular. Após a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, ele se liga a um componente da troponina e causa alterações conformacionais que são transmitidas à tropomiosina e, então, à actina. Essas alterações estruturais tornam possível a interação da actina e da miosina, resultando na contração muscular e na hidrólise de ATP. Essa condição perdura até que o cálcio seja retirado. A interação entre os filamentos de actina e miosina gera a força de contração, e os filamentos de actina de cada metade do sarcômero são puxados em direção ao centro do sarcômero, formando o complexo protéico chamado de actomiosina. Durante a contração, o comprimento individual dos filamentos de actina e miosina não se altera. A diminuição do sarcômero é provocada pelo deslizamento dos filamentos ao longo de si mesmos, puxando as linhas Z mais próximas dos filamentos de miosina. Durante a contração, o filamento deslizante requer uma ligação cíclica (ligando e desligando alternadamente), e cada ciclo contribui com uma pequena parte da contração total. A força de contração é gerada pela mudança no ângulo de ligação da cabeça da miosina ao filamento de actina. No músculo em repouso, o ATP liga-se à cabeça da miosina, causando dissociação da actina. Com a hidrólise do ATP ligado firmemente, ocorre uma mudança de conformação. O ADP e o P_i permanecem associados à cabeça da miosina, que, em seguida, liga-se ao filamento de actina, causando liberação do P_i . A liberação

— ▼ —
Durante a contração a largura da banda A permanece constante mas as larguras da banda I e da zona H diminuem.

desse íon desencadeia uma mudança de conformação da cabeça de miosina, que move os filamentos de actina e de miosina um em relação ao outro. O ADP é liberado nesse processo. A largura da banda A é constante durante todas as fases da contração muscular, mas as larguras da banda I e da zona H mudam. Essas larguras são maiores quando o músculo está estendido e diminuem quando o músculo está contraído. Em músculos severamente encurtados, os filamentos de actina interpenetram-se, ou até sobrepõem-se, e o centro da banda A e as linhas Z podem tocar as extremidades dos filamentos de miosina. Nessas condições, a zona H e a banda I não são distinguíveis em microfotografias (Figura 7.10).

A contração muscular requer uma quantidade adicional de energia, além da que é normalmente consumida pelo

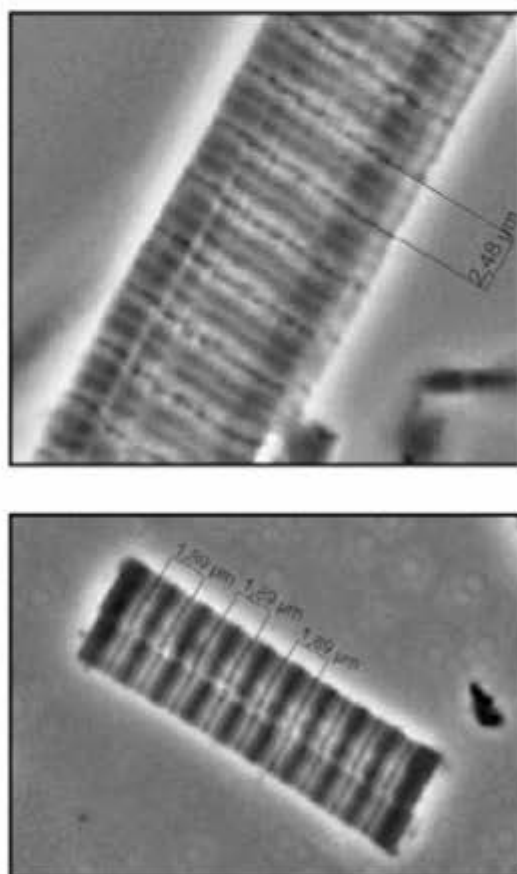


Figura 7.10 Micrografias ópticas (100×10) em contraste de fase mostrando fragmentos de miofibrilas com sarcômeros em diferentes intensidades de contração (cortesia do professor Cristiano Sales Prado, EV/UFG).

Com o fim do impulso nervoso, o retículo sarcoplasmático passa a recolher o cálcio, reduzindo sua concentração no sarcoplasma.

A troponina retoma sua capacidade de manter actina e miosina afastadas e, cessando a atividade ATPásica das cabeças de miosina, ATP volta a se acumular, provocando o deslizamento do sarcômero e caracterizando o relaxamento.

Quando o animal é abatido o músculo não cessa instantaneamente suas funções vitais, o ATP continua fornecendo energia para as funções musculares durante um certo período de tempo.

músculo em repouso. Essa energia é proveniente do ATP por uma reação catalisada pela enzima miosina-ATPase, na qual o ATP é hidrolisado a adenosina-difosfato (ADP) e a fosfato inorgânico (P_i). A hidrólise é intensificada pela liberação de íons de cálcio no sarcoplasma. A ligação entre a actina e a miosina converte a energia química em energia mecânica e inicia o deslizamento dos filamentos, gerando uma força contrátil.

Relaxamento do músculo esquelético. O relaxamento muscular é definido como sendo o restabelecimento do estado de repouso. A primeira etapa é a repolarização da membrana para que as etapas subseqüentes possam ocorrer. A concentração de íons cálcio intracelular diminui pela ação do retículo sarcoplasmático. Com a diminuição da concentração de cálcio livre no sarcoplasma, as moléculas de troponina liberam o cálcio ligado. À medida que o cálcio ligado é liberado pela troponina, ela é novamente capaz de inibir a formação de pontes entre os filamentos de actina e miosina, impedindo a contração.

O papel do ATP como fonte de energia. O ATP é a fonte de energia no processo de contração, no bombeamento de cálcio durante o relaxamento e na manutenção do gradiente de sódio e potássio no sarcolema. O processo de contração é o que necessita de maior quantidade de energia. Quando o animal é abatido, o músculo não cessa instantaneamente suas funções vitais. O ATP continua fornecendo energia para as funções musculares durante um período de tempo. Na tentativa de se manterem os níveis de ATP, ocorre a conversão de ADP em ATP por refosforilação. A fonte mais imediata que pode ser utilizada para a síntese de ATP é a fosfocreatina. A formação de ATP segue a reação abaixo, que ocorre no sarcoplasma, sendo a creatinoquinase a enzima envolvida:



A concentração de fosfocreatina no músculo relaxado é de aproximadamente duas vezes o nível final de ATP. A refosforilação da creatina ocorre na membrana mitocondrial. O mecanismo mais eficiente para a síntese de ATP

O ATP do músculo pode ser formado pela respiração celular (metabolismo aeróbico), gerando CO_2 e água, pela glicólise (metabolismo anaeróbico), gerando ácido láctico e água, ou pela ação da creatinaquinase usando os estoques de fosfocreatina.

consiste em uma série de reações coletivamente referidas como metabolismo aeróbico. Essas reações envolvem a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico. As reações da glicólise ocorrem no citoplasma, enquanto as do ciclo do ácido tricarboxílico ocorrem dentro da mitocôndria. A glicólise é a seqüência das reações que convertem a glicose em ácido pirúvico, com produção concomitante de ATP. Em condições aeróbicas, o ácido pirúvico é completamente oxidado a CO_2 e H_2O pelo ciclo do ácido tricarboxílico, também conhecido por ciclo do ácido cítrico ou, simplesmente, ciclo de Krebs. No caso de o suprimento de oxigênio ser insuficiente, o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico. A glicólise é um meio de obtenção rápida de ATP, sob condições anaeróbicas, tais como as que ocorrem em caso de estresse ou após a morte do animal.

Quando o músculo contrai rapidamente, como durante um esforço físico excessivo, o suprimento de oxigênio torna-se insuficiente para a ressíntese de ATP via metabolismo aeróbico. Não havendo oxigênio suficiente, ocorrerá um acúmulo de íons hidrogênio no músculo. Esse hidrogênio será então utilizado na conversão de ácido pirúvico em ácido láctico, o que permite que a glicólise se processe rapidamente. As conseqüências são: menor produção de energia e acidificação de pH devido ao acúmulo de ácido. Essa acidificação de pH irá diminuir a velocidade da glicólise. Sob essas condições, ocorre a fadiga. Devido à falta de energia e ao acúmulo de acidez, o músculo não consegue mais contrair-se. Na recuperação do músculo da fadiga, o ácido láctico acumulado é transportado via sistema sanguíneo até o fígado, onde é reconvertido em glicose. O ATP, então, é novamente produzido por meio do processo aeróbico normal.

No animal vivo, a energia da célula é obtida pela oxidação da glicose fornecida pela corrente sanguínea ou pelo consumo do glicogênio armazenado. Havendo produção de ácido láctico pela glicólise, este é removido pela corrente sanguínea até o fígado onde é novamente transformado em glicose.

No trato gastrointestinal do animal vivo, nutrientes, nesse caso a glicose, são absorvidos pelo organismo. A glicose é transportada pelo sistema circulatório para o fígado (onde é convertida em glicogênio) para ser armazenada, ou para o músculo onde ela possa ser metabolizada ime-

diatamente em energia ou armazenada como glicogênio para um uso futuro. O glicogênio armazenado no fígado pode ser hidrolisado a glicose e transportado ao músculo de acordo com a necessidade. No músculo, o glicogênio é metabolizado a piruvato pela via glicolítica. O piruvato é metabolizado no ciclo do ácido tricarboxílico, formando posteriormente dióxido de carbono e água ou sendo convertido a ácido láctico. O ácido láctico, o dióxido de carbono e a água são removidos do músculo através da corrente sanguínea. O dióxido de carbono é expelido do organismo através dos pulmões, a água é eliminada através dos rins e o ácido láctico é resintetizado a glicose no fígado ou metabolizado no coração a dióxido de carbono e água. Parte da energia desse metabolismo não é utilizada para a contração muscular e é liberada no músculo na forma de calor para a manutenção da temperatura do corpo. O excesso de calor é removido pela corrente sanguínea e é dissipado pela pele e pelos pulmões. Portanto, pode-se perceber que esse sistema dinâmico é eficaz no fornecimento de energia para o músculo. Apenas em períodos muito rápidos de contração muscular é que esse sistema torna-se incapaz de acompanhar a demanda de energia. Entretanto, quando isso ocorre, a fadiga desenvolve-se rapidamente, e o músculo deve cessar a contração para permitir a recuperação do organismo.

▼
A fadiga acontece quando um músculo se contrai tão rapidamente que a glicólise não é capaz de fornecer ATP suficiente para a contração e simultaneamente se acumula muito ácido láctico provocando forte abaixamento do pH.

► Mudanças bioquímicas pós-morte no músculo

► Conversão do músculo em carne

Uma grande quantidade de reações bioquímicas e físico-químicas acontece a partir do momento no qual o animal é morto até ser consumido como carne. Esse período pode ser dividido em três fases distintas: *pré-rigor*, *rigor mortis* e *pós-rigor*.

Fase de pré-rigor

Nesta fase, o tecido muscular é macio, flexível e caracterizado bioquimicamente pela queda nos níveis de ATP e de creatina-fosfato e pela glicólise ativa. A glicólise

▼
Pré-rigor – tecido macio com glicólise ativa e acidificação do pH.

pós-morte resulta na conversão do glicogênio em ácido láctico, causando queda no pH. O grau de mudança no pH varia de uma espécie para outra e também entre músculos diferentes. Contudo, em animais previamente descansados e bem alimentados, as reservas de glicogênio são maiores, produzindo no período de pós-morte uma carne com pH menor se comparado ao de carnes obtidas de animais exaustos no momento do abate.

Fase de rigor mortis

Esta fase é caracterizada pelo desenvolvimento de uma condição de rigidez e inflexibilidade no músculo. Ocorre quando o pH do músculo cai e está associado à formação do complexo actomiosina. A perda de extensibilidade associada à formação da actomiosina acontece lentamente no início (fase lenta) e passa a extremamente rápida (fase rápida). O começo do *rigor mortis* ocorre normalmente, 1 a 12 h do pós-morte, e pode durar por até 15 a 20 h em mamíferos, dependendo de inúmeros fatores. Peixes geralmente exibem um período de *rigor mortis* menor, com início 1 a 7 h após a morte.

Fase de pós-rigor

Esta fase é aquela na qual a carne normalmente torna-se gradualmente tenra e macia, tornando-se sensorialmente aceitável durante o progresso da maturação. Carnes de mamíferos normalmente atingem aceitabilidade ótima quando estocadas por 2 a 3 semanas a 2°C após a fase de *rigor mortis*.

Após a morte do animal, a circulação sanguínea cessa, o que resulta em uma complexa série de mudanças no tecido muscular. Uma vez que o sangue é um meio ideal para crescimento de microrganismos deterioradores, o processador procura remover a maior quantidade possível de sangue da carcaça do animal para garantir que a qualidade e a comestibilidade da carne sejam mantidas. O efeito mais imediato da parada da circulação sanguínea e da eliminação do sangue do tecido muscular é a queda

Rigor mortis – Formação do complexo actomiosina com rigidez do tecido.

Pós-rigor – Maturação: processo gradual de amaciamento e melhoramento das características sensoriais.

no suprimento de oxigênio para o tecido e a subsequente queda no potencial de oxidorredução. Isso resulta na inabilidade do músculo em ressintetizar ATP uma vez que a cadeia de transporte de elétrons e o mecanismo de fosforilação oxidativa já não acontecem.

► ATP e mudanças no pós-morte

A maior fonte de ATP para as fibras musculares é perdida após a morte do animal, pois o glicogênio já não pode ser oxidado em dióxido de carbono e água. Em seu lugar toma parte o metabolismo anaeróbico, resultando na conversão do glicogênio em ácido láctico. Sob condições normais, 39 moléculas de ATP são produzidas para cada unidade de glicose do glicogênio oxidada, enquanto somente três moléculas de ATP são produzidas para cada unidade de hexose oxidada sob condições anaeróbicas.

O tempo para o desenvolvimento da primeira fase do *rigor mortis* é determinado pelo nível de ATP no pós-morte. O nível de ATP é também diminuído pela atividade não-contrátil da ATPase da miosina que mantém a temperatura e a integridade estrutural da célula muscular. Isso resulta na produção de fosfato inorgânico (P_i), que estimula a degradação do glicogênio em ácido láctico. O fosfato inorgânico é essencial para a ação da enzima fosforilase na conversão do glicogênio em glicose-1-fosfato, que é o primeiro passo da degradação do glicogênio em ácido láctico. Além da ATPase da miosina, o retículo sarcoplásmico também tem atividade de ATPase.

O nível de ATP é mantido no músculo após a morte do animal pela creatinoquinase ativa que catalisa a res-síntese de ATP a partir de ADP e creatina-fosfato. Dessa maneira, no início do pós-morte ou fase de pré-rigor, a concentração de ATP permanece relativamente constante, uma vez que existe um rápido declínio nos níveis de creatina-fosfato.

O músculo de mamíferos é capaz de manter o seu nível de ATP por várias horas após a morte. No entanto, a atividade contínua de diversas ATPases nas células

Com o fim da circulação sanguínea acaba o fornecimento de oxigênio e glicose para as fibras musculares, e a partir daí a síntese de ATP deve ser feita pela via glicolítica (anaeróbica).

A atividade ATPásica na célula permanece alta, embora a síntese de ATP esteja limitada às reservas de glicogênio e fosfocreatina; em consequência, a tendência é o término do ATP muscular, que pode acontecer de 1 a 12 h após o abate. Com o fim do ATP, forma-se o complexo actomiosina caracterizando o *rigor mortis*.

Na fase de *rigor mortis* ocorre a desaminação do AMP em IMP que, por sua vez, sofre degradação gerando inosina e hipoxantina.

musculares, incluindo as do retículo sarcoplasmático, da mitocôndria, do sarcolema e das miofibrilas, contribui para o declínio nos níveis de ATP no músculo. Devido à essa queda nos níveis de ATP e de creatina-fosfato e à incapacidade da glicólise em sintetizar ATP em uma taxa efetiva, ocorre a formação do complexo actomiosina, o que torna o músculo duro e inextensível.

► Metabolismo do ATP no pós-morte

O desenvolvimento do *rigor mortis* em animais é uma resposta direta ao declínio dos níveis de ATP. Em geral, observa-se a liberação de amônia durante a fase de *rigor mortis*. Isso ocorre devido à desaminação do ácido adenílico (AMP) em ácido inosínico (IMP). Nessa fase, os níveis de ATP e ADP diminuem rapidamente, enquanto a concentração de IMP, inosina e hipoxantina aumentam consideravelmente. Essas reações em músculos de mamíferos são catalisadas pelas enzimas ATPase, mioquinase e desaminase. A conversão de ATP em IMP ocorre no momento que o pH final da carne é atingido, enquanto a degradação do IMP ocorre após o estabelecimento do pH final.

► Glicólise e pH no pós-morte

Uma vez que o suprimento de oxigênio no tecido muscular diminui, o glicogênio, principal carboidrato do músculo animal, entra em um processo de glicólise anaeróbia para produção de ácido láctico. A taxa de glicólise em músculos no pós-morte é afetada pela temperatura, pelo tipo de fibra muscular, por secreções hormonais, assim como pela intensidade dos estímulos nervosos no músculo antes e após o abate. Esse efeito no músculo será discutido adiante, no item *Implicações tecnológicas*.

A produção de ácido láctico provoca a queda nos valores de pH do tecido muscular. O pH fisiológico que originalmente encontrava-se na faixa de 7,2 a 7,4 cai para um pH final de 5,3 a 5,5. É particularmente importante alcançar o menor pH possível no músculo uma vez que

A ocorrência de glicólise provoca a formação de ácido láctico, que causa acidificação do músculo. O pH final chega a cerca de 5,3 - 5,5, o que ajuda a controlar a deterioração microbiana e melhora o aspecto (cor) da carne.

O estresse causado pelo manejo inadequado no pré-abate é a principal causa da queda dos níveis de glicogênio no músculo.

o pH ácido é responsável por uma cor mais desejável da carne, além de retardar o crescimento de bactérias deteriorantes. O pH final pode ser obtido dentro das primeiras 24 h do período pós-morte. Um pH de 5,3 a 5,5 é obtido em músculos de animais descansados e alimentados antes do abate, devido ao nível máximo de glicogênio alcançado. Animais que sofrem morte grave ficam fatigados antes do abate e são caracterizados por apresentar baixos níveis de glicogênio nos tecidos.

Níveis menores de glicogênio resultam em um pH final no pós-morte em torno de 6,0 a 6,5, produzindo uma carne de textura fechada, seca e escura, que é muito mais suscetível à deterioração microbiana. Essa carne, conhecida como DFD (*dark, firm and dry*) ainda representa um problema sério de qualidade em carnes. O manejo inadequado dos animais no pré-abate ainda é considerado a maior causa de estresse fisiológico e esgotamento dos animais. O excesso de exercícios físicos nos animais, agressões causadoras de estresse (transporte, movimentação, contato com outros animais) e permanência em jejum prolongado causam a queda nos níveis de glicogênio no músculo. O ácido láctico formado é retirado, mas não há tempo para a recomposição das reservas energéticas. Quando os animais são abatidos, a glicólise é lenta por falta de glicogênio no músculo. O pH cai ligeiramente nas primeiras horas e depois estabiliza-se em níveis próximos a 6,0. A medida do pH final da carne é ainda a melhor forma de se caracterizar o problema. Os valores limites de pH para desenvolvimento de carnes DFD estão na faixa de 5,8 a 5,9 como limite inferior e 6,2 a 6,3 como limite superior, esse último indicando condição extrema de DFD.

Quando o animal abatido tem baixa reserva de glicogênio muscular, a glicólise cessa rapidamente, sem o abaixamento completo do pH, que permanece entre 5,8 e 6,3, caracterizando um defeito conhecido por carne DFD (*dark, firm, dry*). Essas carnes apresentam textura mais firme, são pouco exsudativas e escuras e apresentam alta suscetibilidade ao ataque de microrganismos.

O pH final de carnes no pós-morte raramente fica abaixo de 5,3, embora algumas exceções possam ocorrer. Carnes com pH de 5,1 a 5,5 apresentam uma condição exsudativa com cor esbranquiçada e textura frouxa, enquanto carnes com pH menores que 4,8 apresentam fibras musculares anormais. Essas condições não são inespera-

das, pois o ponto isoelétrico da maioria das proteínas da carne é em torno do pH 5,5, o que pode levar à perda da capacidade de retenção de água. No entanto, existe uma condição na qual a carne possui pH final considerado normal, mas apresenta características de carnes como as indicadas antes: exsudativa, esbranquiçada e textura frouxa. É o caso das carnes PSE (*pale, soft, exudative*). O que acontece com esse tipo de carne é que a queda de pH, devida à produção de ácido, é mais rápida do que a de uma carne normal. Em condições normais, o pH da carne fica na faixa de 5,5 a 5,8 após aproximadamente 8 h. Na carne PSE, o pH cai a valores próximos de 5,8 já na primeira hora após o abate. A caracterização de uma carne PSE só pode ser feita quando se mede o pH da carne na primeira hora após o abate. A queda brusca do pH da carne PSE ocorre antes da dissipação de calor da massa muscular, causando desnaturação das proteínas musculares. O grau de desnaturação das proteínas depende da temperatura do músculo e do valor de pH atingido logo após o abate. A desnaturação causa uma redução na solubilidade das proteínas, uma perda na capacidade de retenção de água e uma aparente descoloração do músculo que caracterizam esse tipo de carne. Tal problema ocorre com maior frequência em suínos, embora possa ocorrer também em bovinos e aves.

O declínio no pH durante o período pós-morte, portanto, é diferenciado para as carnes normal, DFD e PSE, o que pode ser verificado na Figura 7.11.

► Implicações tecnológicas

Diversos fatores pré- e pós-morte podem influenciar a qualidade final da carne. Tal como percebida pelo consumidor, a qualidade da carne resulta da interação de três itens — maciez, suculência e sabor. Entretanto, o componente da qualidade que apresenta maior variação e, conseqüentemente, gera maior insatisfação nos consumidores é a maciez.

Quando o pH da carne cai muito rapidamente, na carcaça ainda quente, acontece a perda de solubilidade e da capacidade de retenção de água das proteínas miofibrilares. Com isso, a carne se mostra pálida, mole e excessivamente exsudativa, caracterizando um defeito conhecido por carne PSE (*pale, soft, exudative*).

A qualidade da carne se deve à sua maciez, à suculência e ao sabor, sendo a maciez o fator que gera maior insatisfação no consumidor.

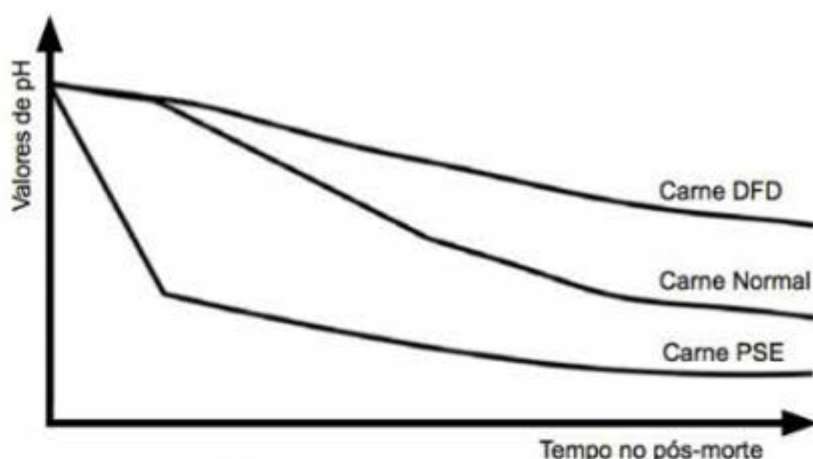


Figura 7.11 Perfil de queda do pH para carnes normal, PSE e DFD.

Dentre os fatores pré-abate que influenciam as características de qualidade da carne, o principal é o estresse, relacionado ao manejo dos animais. Também podem ser citados fatores como espécie, hereditariedade, idade e sexo do animal e localização do músculo. As principais características de qualidade que podem ser influenciadas por esses fatores são a textura, a cor e a capacidade de retenção de água.

As mudanças que ocorrem durante a conversão dos músculos em carne (pós-abate) também podem afetar diversos parâmetros de qualidade das carnes, tais como maciez, suculência, cor e aroma, além das propriedades funcionais como capacidade de retenção de água, capacidade de emulsificação e perdas no cozimento. Todos os fatores pré- e pós-abate podem ser, até certo ponto, controlados para favorecer a obtenção de carne de melhor qualidade, conforme discutido a seguir.

► Fatores pré-abate que afetam a qualidade das carnes

Hereditariedade. Pode-se dizer que as propriedades físicas do músculo e, conseqüentemente, da carne, tais como cor, maciez e marmoreio (gordura intramuscular responsável pela suculência) são moderadamente hereditárias; ou seja, os criadores também podem contribuir para melhorar a aceitabilidade da carne, criando animais gerados a partir de outros animais que tenham

Dentre os fatores pré-abate que afetam a qualidade da carne o principal é o estresse.

Os fatores pré- e pós-abate podem ser controlados para favorecer a obtenção de carne de melhor qualidade.

São também considerados importantes para a qualidade da carne os seguintes fatores pré-abate: 1. *Hereditariedade* – predisposição genética do animal; 2. *Idade* – relacionada com a quantidade e a formação de ligações cruzadas do colágeno; 3. *Localização* – se o músculo em questão é bastante utilizado e se, durante o rigor, ele pode se encurtar ou não; 4. *Sexo* – machos não-castrados são especialmente problemáticos; 5. *Manejo pré-abate* – ocorrência de estresse que leva à produção de carnes defeituosas (DFD e PSE).

características de qualidade comprovadas. A espécie animal é o fator que mais afeta a consistência da carne.

Idade. O envelhecimento do animal é acompanhado pelo aumento da concentração de mioglobina dos músculos e conseqüente escurecimento e da redução da maciez (endurecimento) devido às transformações do tecido conjuntivo (maior quantidade de ligações cruzadas entre as cadeias de colágeno). No entanto, o endurecimento dos músculos com a idade não é necessariamente linear. Durante a fase de rápido crescimento do animal, a maciez aumenta com o tempo devido ao rápido desenvolvimento muscular que não é acompanhado simultaneamente pelo do tecido conjuntivo, o que pode explicar como animais abatidos com 12 a 18 meses podem apresentar carne mais macia que bezerros de 6 meses. Também em função do constante desenvolvimento muscular, mesmo animais mais velhos, mas que são alimentados constantemente, sem restrições alimentares nos períodos de secas, tendem a apresentar carnes mais macias.

Localização do músculo. Diferenças no conteúdo de colágeno dos músculos podem explicar diferenças na textura desses músculos; quanto maior o teor de colágeno, tanto maior será a dureza de um músculo. O conteúdo de colágeno está diretamente relacionado à utilização do músculo pelo animal. No entanto, não é apenas o teor de colágeno que explica as diferenças de textura dos diferentes músculos. A liberdade ou não para contrair (encurtar) durante a instalação do *rigor mortis* também é um fator muito importante e depende da localização do músculo na carcaça e da posição da carcaça durante esse período.

Sexo. Animais machos não-castrados tendem a apresentar problemas de qualidade. Primeiramente, em relação aos hormônios sexuais que conferem odor desagradável, principalmente nos suínos machos. Além disso, bovinos não-castrados tendem a apresentar uma carne com maior teor de colágeno (mais dura) e também mais escura, devido à maior concentração de mioglobina e maior tendência ao estresse, que pode levar à carne DFD.

▼

A maturação é um processo de alterações naturais cujo resultado é o desenvolvimento do amaciamento da carne, do sabor e do aroma característicos.

Manejo pré-abate. Pode-se citar como etapas do manejo pré-abate o carregamento, o transporte, o tempo de repouso no frigorífico e o jejum (dieta hídrica) ao qual o animal é submetido durante todo esse processo. Todas essas etapas são estressantes, em maior ou menor grau, dependendo de fatores como clima, equipamentos e pessoal utilizado. Os efeitos indesejáveis que podem ocorrer causados pelo manejo pré-abate inadequado incluem fraturas e hematomas, mortes no transporte e problemas relacionados à depleção das reservas de glicogênio dos músculos (DFD) e ao estresse pré-abate (PSE).

► Fatores pós-abate que afetam a qualidade das carnes

Maturação

A maturação é um processo de alterações naturais que ocorrem na carne no pós-morte durante o armazenamento, de -1°C até temperaturas abaixo da desnaturação. O resultado desse processo é o desenvolvimento do amaciamento da carne e do sabor e do aroma característicos.

Quanto mais alta a temperatura, maior a velocidade de manifestação dos efeitos da maturação. No entanto, existe um limite no aumento de temperatura uma vez que temperaturas altas favorecem o crescimento de microrganismos deteriorantes. Quanto mais baixa a temperatura da carne resfriada, menor será o crescimento microbiano. Em geral, opta-se por manter a carne próxima de sua temperatura de congelamento (-2°C) para reduzir o crescimento microbiano ao mínimo e proporcionar uma maior vida útil.

▼

Quanto mais alta a temperatura maior a velocidade das transformações durante a maturação e quanto mais baixa a temperatura menor o crescimento microbiano, proporcionando maior vida útil.

Inicialmente, a variação na textura da carne era atribuída somente ao tecido conjuntivo, pois músculos com menor quantidade de tecido conjuntivo resultavam em carnes mais macias. No entanto, não era possível explicar por que músculos com a mesma quantidade de tecido conjuntivo apresentavam diferenças em sua textura. Trabalhos realizados no início dos anos 1960 indicaram a possibilidade da influência das proteínas contráteis na maciez da carne; e outros estudos, décadas depois,

▼

O desenvolvimento gradual da maciez após o rigor se deve ao período de maturação, no qual as calpaínas (proteases endógenas) hidrolisam as proteínas relacionadas com a linha Z, provocando o amaciamento.

▼

A atividade das calpaínas é controlada pelas concentrações de cálcio e do inibidor específico calpastatina. As condições de armazenamento refrigerado da carne influenciam consideravelmente a maturação.

indicaram que a carne estocada por algum tempo em temperatura logo acima da de congelamento apresentava filamentos de actina que se desprendiam da linha Z. Acreditava-se que as proteínas miofibrilares sofriam proteólise parcial pelas catepsinas lisossomais cujo pH ótimo, em torno de 5,0, coincidia com o pH final da carne após o *rigor mortis*, que é de aproximadamente 5,5. O fato de que a maciez da carne bovina aumenta com o aumento do período de estocagem sem que ocorra o rompimento das ligações do complexo actomiosina e as evidências de que as alterações ocorridas eram de origem proteolítica causaram questionamentos a respeito do sistema enzimático envolvido na maturação. Atualmente, os efeitos da maturação têm sido associados à ação de um sistema de enzimas proteolíticas naturais endógenas, chamadas de calpaínas, e de seu inibidor específico, a calpastatina.

As calpaínas são endopeptidases intracelulares não lisossomais geralmente mais concentradas próximo à linha Z. São proteinases que dependem de íons cálcio para manifestarem sua atividade. As duas formas mais conhecidas de calpaínas são a μ -calpaína e a m-calpaína; essa última é mais dependente da concentração de cálcio. Outras formas de calpaínas estão sendo estudadas, mas ainda não tiveram sua função descrita completamente. Sabe-se que a maciez da carne em processo de maturação é primeiramente causada pela μ -calpaína, pois ela demanda menor concentração de íons cálcio (5 a 45 μM) e, no músculo pós-morte, a concentração de íons cálcio é suficiente para ativá-la. A m-calpaína somente agirá se houver maior aporte desses íons (200 a 1.000 μM). Essas enzimas, na presença desses íons, sofrem autólise, que tem papel fisiológico importante, pois a atividade dessas enzimas depende disso. Quando autolisadas, essas enzimas tornam-se sensíveis a concentrações menores de íons cálcio.

A atividade proteolítica das calpaínas é regulada pela calpastatina, uma proteína que exerce ação inibidora específica. Quanto mais calpastatina na célula, mais alto é o requerimento de íons cálcio para a atividade das calpaínas. A quantidade de calpaína que pode ser ati-

vada, mantendo-se a mesma concentração de cálcio, é controlada pela concentração de calpastatina.

O processo de conversão do músculo em carne é complexo e envolve uma série de alterações no metabolismo celular, bem como na estrutura protéica, que se caracterizam pelo *rigor mortis*, queda do pH, glicólise, esgotamento das reservas de ATP, entre outros, como já visto anteriormente, neste capítulo. A combinação desses eventos causa o aparecimento de novas condições intracelulares, ainda não muito bem determinadas, mas que favorecem a ação das calpaínas, resultando no amaciamento da carne.

Os métodos mais utilizados para a produção de carne maturada incluem a *maturação a seco*, a *maturação rápida* e a *maturação em embalagem a vácuo*.

Maturação em embalagem a vácuo. Pode-se definir a maturação comercial como um processo tecnológico que utiliza condições controladas, no qual a carne fresca é embalada a vácuo e mantida a temperaturas de -1 a 2°C , por 14 dias. No Brasil, o tempo de maturação usual é de 14 a 21 dias, pois se levam em consideração as características do gado brasileiro, 80% constituído de bovinos de origem indiana. Raças européias apresentam os efeitos da maturação com 14 dias e o das raças indianas com 21 dias, pois a razão calpastatina/calpaína é maior nas raças zebuínas.

Maturação a seco. A carne é mantida a temperaturas de $1,1$ a $3,3^{\circ}\text{C}$, por 6 a 10 semanas em câmara de umidade relativa controlada.

Maturação rápida. A carne é mantida a temperatura muito mais alta, cerca de 21°C , por 2 dias ou menos, com umidade relativa controlada e luz ultravioleta para reduzir a população microbiana.

► Problemas relacionados à temperatura das carcaças no pós-abate

Logo após o abate, é necessário um rápido abaixamento da temperatura para conservar a carne, evitar a

Os métodos mais utilizados para a maturação de carnes incluem a maturação a seco, a maturação rápida e a maturação em embalagem a vácuo.

A seco: temperatura até $3,3^{\circ}\text{C}$ por até 10 semanas. Rápida: temperatura de 21°C por até 2 dias, com luz U.V. Em embalagem a vácuo: temperatura entre -1 e 2°C por de 14 a 21 dias.

Quando a carne é congelada no período de pré-rigor, todo o processo de instalação do *rigor mortis* cessa e recomeça durante o descongelamento. Nesses casos, em virtude do rompimento do retículo sarcoplasmático, há grande liberação de cálcio no sarcoplasma, o que provoca encurtamento significativo do músculo, provocando drástico endurecimento.

Quando a carcaça é resfriada no período de pré-rigor há paralização das enzimas transportadoras do retículo sarcoplasmático com vazamento de cálcio para o sarcoplasma, o que leva à formação de carnes extremamente duras. Em geral, para evitar o *encurtamento pelo frio*, a temperatura deve ser mantida acima de 15°C por um período de até 10 h após o abate.

proliferação de microrganismos deterioradores ou mesmo patogênicos e também minimizar a desnaturação protéica. Por outro lado, uma redução muito rápida da temperatura do músculo nesse período, ou seja, na fase de pré-*rigor mortis*, pode acarretar defeitos, principalmente quanto ao endurecimento da carne.

Nesse caso, dois são os problemas que podem ocorrer: rigor da descongelação (*thaw rigor*) e encurtamento pelo frio (*cold shortening*). O *rigor da descongelação* caracteriza-se por um encurtamento grave, que ocorre durante o descongelamento de um músculo que foi congelado no estado pré-rigor. A contração produzida nesse caso é consequência da repentina liberação do Ca^{++} no sarcoplasma, acarretando um encurtamento de cerca de 60% do tamanho original de músculos previamente desossados. A contração é normalmente acompanhada da liberação de grandes quantidades de sucos cárneos e drástico endurecimento.

Conquanto seja menor o grau de encurtamento em músculos ligados ao esqueleto do que em músculos desossados, ainda assim perdas de textura e outros atributos podem ocorrer. Se antes do rigor o músculo alcançar temperaturas superiores a 0°C, mas inferiores a 15 ou 16°C, origina-se o tipo de contração chamada de *encurtamento pelo frio*. Carnes de carcaças que atingirem, durante o resfriamento, temperaturas inferiores a 10°C no centro do coxão, em tempo inferior a 10 h, apresentam forte predisposição para esse encurtamento. Tal carne, após a cocção, é extremamente dura. O encurtamento pelo frio não acontece se o músculo permanecer suficientemente provido de oxigênio, que é o que acontece quando o músculo é desossado e moído logo após o abate, antes do *rigor mortis* (ver Processamento Acelerado, mais adiante neste capítulo). Os músculos vermelhos são mais propensos a sofrer esse processo que os músculos brancos. Supõe-se que a maior quantidade de mitocôndrias nos músculos vermelhos em relação aos músculos brancos tenha relação com esse encurtamento. A queda rápida

▼

O resfriamento da carcaça tem por principal finalidade controlar o crescimento microbiano e aumentar a vida útil da carne.

As instalações frigoríficas modernas podem resfriar os músculos superficiais da carcaça muito rapidamente, causando o encurtamento pelo frio.

da temperatura após o abate, ainda no estado pré-rigor provoca um aumento grande na concentração de íons Ca^{2+} no sarcoplasma, de cerca de 30 a 40 vezes a concentração de íons em torno das miofibrilas. Como consequência, a enzima actomiosina-ATPase é ativada. Em condições anaeróbias *post-mortem*, os íons Ca^{2+} procedentes das mitocôndrias e do retículo sarcoplasmático acumulam-se no sarcoplasma devido à perda de capacidade do retículo sarcoplasmático para reter os íons Ca^{2+} (bomba de cálcio) liberados a baixas temperaturas. É comum o desaparecimento completo da banda I do sarcômero de músculos que sofrem esse tipo de lesão. A carne endurecida por encurtamento pelo frio não amacia com a maturação.

As implicações práticas do resfriamento pré-rigor são bastante importantes, uma vez que as instalações frigoríficas modernas podem ser muito potentes e resfriar principalmente os músculos superficiais das carcaças tão rapidamente, que ocorra o encurtamento pelo frio. As camadas de gorduras (acabamento) superficiais das carcaças servem como isolantes, diminuindo a velocidade de resfriamento dos músculos. Porém, a tendência de se buscar a produção de animais com menos gordura e também com menor predisposição para depositar gordura, característica das raças zebuínas predominantes no Brasil, pode acarretar maior incidência desse tipo de problema se não houver um bom controle do resfriamento das carcaças nos frigoríficos.

▼

A instalação acelerada do rigor com encurtamento drástico também pode acontecer em temperaturas elevadas e se deve à aceleração dos processos bioquímicos pela temperatura com rápido consumo do ATP muscular.

Por outro lado, encurtamento drástico e instalação acelerada do *rigor mortis* podem ocorrer pela exposição do músculo a temperaturas elevadas (até 50°C) logo após o abate. O chamado *rigor do aquecimento*, que então se processa, é resultado de uma rápida depleção das reservas de ATP. Conseqüentemente, parece haver uma temperatura ótima na qual os músculos devem ser mantidos durante a instalação do *rigor mortis*. O grau de encurtamento muscular ou desenvolvimento da tensão isométrica está diretamente relacionado à temperatura, tendo como limite inferior 14°C, abaixo do qual o músculo tende a encurtar-se e a endurecer no cozimento.

Para prevenir defeitos e/ou acelerar a maturação podem ser aplicadas diversas técnicas: processamento acelerado, estimulação elétrica e *tenderstretch*.

Considera-se que a relação *encurtamento pelo frio/dureza da carne* nunca é linear, porém aumentada de 20 até 40% do comprimento inicial, para diminuir novamente à medida que o encurtamento amplia-se até 60%.

► Técnicas para minimizar os problemas de textura em carnes

As estratégias para melhorar a maciez das carnes devem abranger passos para prevenir/minimizar o endurecimento pós-abate ou acelerar/melhorar a fase de amaciamento (maturação).

Processamento acelerado

Consiste em alguns processos, como desossa, corte e moagem imediatamente após o abate e evisceração do animal.

A desossa de carcaças, com remoção de ossos e gorduras antes do resfriamento, reduz o requerimento de energia e o espaço nas câmaras frias (vantagem econômica) e garante um melhor controle dos processos de refrigeração de carnes. Esse processo é conhecido como *desossa à quente (hot boning)*. Quando carnes desossadas logo após o abate são mantidas, durante a instalação do *rigor mortis*, em temperaturas que evitam o encurtamento (15 a 16°C), elas não necessitam da proteção contra o encurtamento gerada pela ligação dos músculos aos ossos.

Processamento acelerado: desossa, corte e moagem do músculo. Por favorecer o metabolismo aeróbico, reduz a acidificação aumentando a capacidade de retenção de água.

Muitas das alterações que ocorrem na qualidade da carne são decorrentes da queda do pH após o abate do animal. Mesmo sabendo que a taxa de declínio do pH pode ser acelerada com a moagem da carne na fase pré-rigidez, o limite do declínio, em algumas espécies, é reduzido quando o tecido é moído antes da glicólise ser completada. Isso se deve provavelmente à incorporação de oxigênio nos tecidos, o que garante a continuação do metabolismo aeróbico, gerando menos ácido láctico como produto final. Com isso, certos benefícios podem ser obtidos, pois carnes com pH mais alto (nesse caso, em torno de 0,2 a 0,3 unidade de pH) apresentam melhor capacidade de retenção de água e de emulsificação.

Estimulação elétrica

Uma outra forma de processamento acelerado para cortes íntegros (desossados, mas não moídos) é acelerar a instalação do *rigor mortis*, antes da desossa, pela técnica conhecida como estimulação elétrica.

Estimulação elétrica: acelera o metabolismo e provoca contrações musculares promovendo o amaciamento.

Consiste na aplicação de corrente elétrica em carcasas logo após o abate, antes do resfriamento. Tem sido aplicada com sucesso para melhorar a maciez da carne de bovinos, ovinos e perus. Esse processo causa uma aceleração da glicólise e conseqüente rápido declínio do pH no período *post-mortem*. As violentas contrações causadas pela estimulação elétrica utilizam grandes quantidades de ATP, acelerando o consumo das reservas energéticas. Na ausência de ATP, os músculos rapidamente entram em *rigor mortis*. A instalação da rigidez se dá enquanto a carcaça ainda está quente, impedindo os efeitos deletérios do encurtamento pelo frio. Por exemplo, em bovinos, o tempo para instalação do *rigor mortis* cai de 15 a 20 h para 4 a 5 h após o abate.

O amaciamento da carne pela estimulação elétrica tem sido atribuído a, principalmente, três fatores: 1º) aceleração da glicólise e, conseqüentemente, do *rigor mortis* antes de as carcaças atingirem a faixa de temperatura que favoreça o encurtamento pelo frio; 2º) ativação das enzimas proteolíticas (lisossomais) devido à acidificação a temperaturas elevadas e 3º) rupturas físicas das fibras em decorrência de violentas contrações musculares. Uma ampla faixa de voltagens pode ser utilizada para estimulação elétrica, com picos que variam de 30 até 3.600 voltz. Algumas indicações mais diretas são 600 a 700 V DC, 3.600 V AC, 200 a 600 V AC.

Tenderstreich: suspensão da carcaça pelo osso do quadril. Evita o encurtamento de alguns músculos durante o rigor.

Suspensão da carcaça em posição especial

Uma técnica diferente de prevenir o encurtamento pelo frio é utilizando-se as restrições naturais ao encurtamento providos pelo esqueleto do animal. A suspensão pélvica (*tenderstreich*) ou a pendura pelo osso do quadril (obturador), permite, durante o estabelecimento do

rigor mortis, um estiramento maior dos músculos mais valiosos (com exceção do filé mignon) em relação ao encurtamento permitido pela pendura tradicional pelo tendão-de-Aquiles. Esse procedimento causa um menor grau de encurtamento pelo rigor nas fibras musculares, resultando em carne mais macia, principalmente nos cortes do quarto traseiro.

De uma maneira geral, essas técnicas (processamento acelerado, estimulação elétrica e suspensão pélvica) não são excludentes, podendo sua utilização ser feita separadamente ou em conjunto.

Como visto, diversas são as técnicas existentes que visam à obtenção de carnes de melhor qualidade. As bases bioquímicas e os parâmetros tecnológicos, conforme descritos ao longo deste capítulo, já estão até certo ponto estabelecidos. Sendo assim, para resolver os problemas de variação na qualidade das carnes, o principal desafio que se apresenta é a adoção dessas técnicas pela indústria da carne.

► Bibliografia

- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. *Bioquímica*. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2004.
- Cipolli, K.M.V.A.B. *Efeito da marinação, da estimulação elétrica e da desossa a quente sobre propriedades físicas, químicas, tecnológicas e sensoriais em M. Triceps brachii (coração da paleta) da raça Nelore*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2004.
- Eskin, M.N.A. *Biochemistry of Foods*. Academic Press, San Diego. 1990.
- Felício, P.E. *O ABC do PSE/DFD*. Alimentos & Tecnologia, 10 (jul./ago.): 54-57. 1986.
- Foegeding, E.A.; Lanier, T.C.; Hultin, H.O. Characteristics of Edible Muscle Tissues. In: Fennema, O. R. *Food Chemistry*. 3ª ed., p. 882-884. Marcel Dekker, Inc., Nova York. 1996.
- Hedrick, H.B.; Judge, M.; Aberle, E.; Forrest J.; Merkel, R.A. *Principles of meat science*. 3ª ed. Kendall/Hunt, Iowa. 1994.

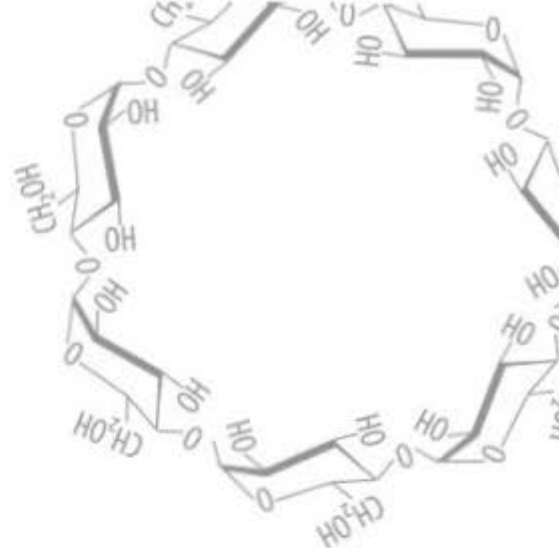
Atualmente o principal desafio para obtenção de carnes de qualidade superior é a adoção das diversas técnicas existentes pela indústria da carne.

Leitura recomendada: Hedrick et al., 1994; Lawrie, 2005; Pardi et al., 1993.

- Kolczak, T.; Pospiech, E.; Palka, K.; Lacki, J. *Changes in structure of psoas major and minor and semitendinosus muscles of calves, heifers and cows during post-mortem ageing*. Meat Science, 64: 77-83. 2003.
- Koohmaraie, M. *Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat*. Meat Science, 43: S193-S201. 1996.
- Lawrie, R.A. *Ciência da carne*. Trad. de Jane Maria Rubensam, 6ª ed. Artmed, Porto Alegre. 2005.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 3ª ed. Sarvier, São Paulo. 2002.
- Mohammad, A.I.; Bekhit, A.E.; Bickerstaffe, R. *The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging*. Meat Science, 66: 387-397. 2004.
- Pardi, M.C. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*, Vol. II. Cegraf-UFG, Goiânia. 1993.
- Pearson, A.M.; Dutson, T.R. *Electrical stimulation*. Advances in meat research, V.1. AVI Book, Connecticut. 1985.
- Rubensam, J.M. *Estudos sobre atividade de calpastatina em carne bovina e obtenção de anticorpo policlonal anti GST-calpastatina*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1999.
- Sgarbieri, V.C. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações*. Livraria Varela, São Paulo. 1996.



Índice Alfabético



A

- Ácido(s), 179
 - ascórbico, 180
 - - alterações, 185
 - desidroascórbico, 180
 - escurecimento de alimentos, 133
 - galaturônico, 40
 - péctico, 41
 - pectínico, 41
- Actina, 209
- Aglicona, posição da ligação, 20
- Alfa-amilases, 25
- Amaciamento da carne, 86
 - imersão, 88
 - injeção, 88
 - método clássico, 88
- Amadurecimento de produtos hortícolas, 155-183
 - mudanças bioquímicas, 169-183
 - - ácidos, 179
 - - carboidratos, 181
 - - coloração, 169
 - - - antocianinas, 173
 - - - antoxantinas, 174
 - - - betalaínas, 175
 - - - carotenóides, 171
 - - - clorofila, 169
 - - compostos fenólicos, 177
 - - compostos voláteis, 175
 - - vitaminas, 179
 - respiração, 156
 - - conceito, 156
 - - etapas, 156
 - - fatores que afetam, 160
 - - - concentração gasosa, 167
 - - - danos mecânicos, 168
 - - - etileno, 160
 - - - temperatura, 165
 - padrões de atividade, 159
- Amarelecimento, 184
- Amido hidrolisado, 32
- Amido, 23
- Amilase, 22-38
 - aplicação industrial, 29
 - - amido hidrolisado, 32
 - - bebidas alcoólicas, 29
 - - panificação, 30
 - fontes, 25
 - métodos de detecção da atividade, 38
 - substrato, 23
- Amiloglicosidase, 27
- Amilopectina, 24
- Amilose, 24
- Aminoácidos, cadeias laterais, 78
- Aminopectidases, 79
- Antocianinas, 173
- Antoxantinas, 174

Aromas

- alterações, 185
- síntese, 120
- vinhos, liberação de precursores, 54

Ascorbato-oxidases, 148

- fontes, 148
- importância em alimentos, 148

Aspartame, 102

Aspergillus, 28, 92

- *niger*, 46, 57, 93
- *oryzae*, 31, 57, 85, 97

ATP

- contração muscular, 215
- pós-morte no músculo, 219

B

Bacillus

- *acidopollulyticus*, 34
- *circulans*, 37
- *licheniformis*, 79, 100
- *macerans*, 37
- *polimeria*, 27
- *subtilis*, 26

Baixa produtividade das enzimas, 12

Baixo potencial de aplicação industrial das enzimas, 14

Bebidas alcoólicas, amilase, 29

Beta-amilases, 26

Beta-ciclodextrina, 37

Beta-frutofuranosidases, 62

Beta-galactosidases, 55

Betalaínas, 175

Bifidobacterium, 61, 71

Bioquímica da carne, 191-234

- composição, 193
- - carcaça, 193
- - músculos e tecidos associados, 193
- - química, 207
- - tecido muscular, 200, 206
- contração, mecanismos, 211
- implicações tecnológicas, 222
- - pós-abate, 225
- - pré-abate e qualidade, 223
- - técnicas para minimizar os problemas de textura, 230
- mudanças bioquímicas pós-morte, 217
- - ATP, 219
- - conversão do músculo em carne, 217
- - glicólise e pH, 220

Bromelina, 82

Brotações, 155

Bulbos, 154

C

Cadeia transportadora de elétrons, 158

Calpaínas, 84, 226

Candida pseudotropicalis, 57

Carboidratos, 19-74

- amilases, 22-38
- características gerais, 20
- celulasas, 45-55
- clivagem da ligação glicosídica, 20
- configuração do substrato, 21
- hemicelulasas, 45-55
- invertases, 62-68
- lactases, 55-62
- lisozima, 69
- modos de ação, 20
- padrões endo- e exo- de atividade, 22
- pectinases, 38-45
- posição da ligação à aglicona, 20
- quitinases, 69
- quitosanases, 69
- tamanho da molécula do substrato, 21

Carboidratos, 18

- degradação durante amadurecimento, 182

Carboxipeptidases, 79

Carcaça

- composição, 193
- temperatura no pós-abate, 227

Carne, bioquímica, 191-234

- composição, 193
- - carcaça, 193
- - músculos e tecidos, 193
- - química, 207
- - tecido muscular, 200-207
- contração, mecanismos, 211
- implicações tecnológicas, 222
- - pós-abate, 225
- - pré-abate e qualidade, 223
- - técnicas para minimizar os problemas de textura, 230
- mudanças bioquímicas pós-morte, 217
- - ATP, 219
- - conversão do músculo em carne, 217
- - glicólise e pH, 220

Carotenóides, 171, 173

- Catalases, 143
 - aplicação industrial, 144
 - atividade, métodos de detecção, 151
 - estruturas, 145
 - fontes, 144
 - Catepsinas, 84
 - Celulases, 45
 - aplicação industrial, 47
 - clarificação de sucos de frutas, 50
 - *cold break*, 50
 - descascamento enzimático, 54
 - extração de sucos, 52
 - *hot break*, 50
 - liberação de precursores de aroma em vinhos, 54
 - liquefação, 52
 - maceração, 53
 - pectinaesterase, 47, 49
 - poligalacturonase, 49
 - fontes, 46
 - métodos de detecção da atividade, 54
 - substrato, 45
 - Celulose, 45
 - Chillproofing*, 86
 - Ciclo de Krebs, 157
 - Ciclo do biocatalisador, 16
 - Ciclodextrinas, 36
 - Cisteína, 135
 - Cisteína-proteases, 80
 - Clarificação
 - cerveja, 85
 - sucos de frutas, 50
 - Climatização da banana, 165
 - Clivagem da ligação glicosídica, 20
 - Clorofila, 169
 - estrutura, 170
 - Clostridium bryotriticum*, 81
 - Coagulação do leite, 89
 - Colágeno, 197
 - Cold break*, 50
 - Coloração, mudanças, 169
 - antocianinas, 173
 - antoxantinas, 174
 - betalainas, 175
 - carotenóides, 171
 - clorofila, 169
 - Complexo de Golgi, 206
 - Composição da carne, 193
 - Compostos
 - fenólicos, 177
 - voláteis, 175, 176
 - Concentração gasosa, 167
 - Conservação de produtos hortícolas minimamente processados, 185
 - Consumidores de enzimas, 3
 - Contração do músculo esquelético, 211
 - ATP como fonte de energia, 215
 - relaxamento, 215
 - Coupling sugar*, 37
- D**
- Descascamento enzimático, 54
 - Descoloração, 84
 - Detergentes, formulação, 122
 - Dextrana sacarase, 72
 - Dextranase, 72
 - Doce de leite, 59
 - Dopa, 129
 - Dopacroma, 129
 - Dopaquinona, 129
- E**
- Enantiosseletividade, 112
 - Endomísio, 195
 - Endoquitosanase, 70
 - Endothia*, 92
 - Enzimas, 5
 - classificação, 7
 - consumidores, 3
 - desmetoxilantes, 41
 - despolimerizantes, 43
 - desramificantes, 28
 - hidrolase, 11
 - identificação, 7
 - isomerase, 11
 - liase, 11
 - ligase, 11
 - macromoléculas hidrolisadas, 6
 - mercado mundial, 4, 5
 - microbianas, 8-10, 15
 - mitos e fatos, 11
 - baixa produtividade, 12
 - baixo potencial de aplicação industrial, 14
 - dependência de co-fatores, 13
 - instabilidade, 12
 - preço alto, 11
 - oxidoreductase, 11
 - transferase, 11

- xilose-isomerase, 35
- Enzyme Commission (EC)*, 7
- Escherichia coli*, 57, 93
- Escurecimento enzimático dos alimentos, 132, 184
- adição de inibidores químicos, 133
- redução do pH (acidificação do produto), 132
- supressão do O₂, 13
- tratamento térmico, 133
- Ésteres de açúcar, 119
- Etileno, 160
- biossíntese, 163
- fermento, 168
- mecanismos de ação e inibição, 161
- produção, 164
- Exoenzimas, 22
- Exopeptidases, 79
- Exoquitosanase, 70
- Extração de sucos, 52

F

- Fibras
 - colágeno, 197, 198
 - elásticas, 198
 - reticulares, 198
- Ficina, 82
- Flores, 154
- Folhas, 154
- Frio, danos causados, 167
- Frutas minimamente processadas, 183
- Frutoligosacarídeos, 66
- Frutos, 155
 - climatéricos, 159
 - não-climatéricos, 159

G

- Galactoligosacarídeos, 61
- Galactose, 40
- Gentiobiose, 36
- Geobacillus stearothermophilus*, 26, 81
- Glicoamilase, 27
- Glicogênio, 24
- Glicólise, 156
 - pós-morte no músculo, 217
- Glicopirranose, representações de Haworth, 21
- Glicose-oxidases, 145
 - aplicação industrial, 146
 - atividade, métodos de detecção, 151
 - fontes, 145
- Grânulos de amido, 24

H

- Hemicelulases, 47
- Hemicelulose, 45
- Hidrolase, 11
- Hidrólise, 98
 - amido, 32
 - - ciclodextrinas, produção, 36
 - - extensiva, 34
 - - parcial, 33
 - - xarope de maltose, 35
- triglicerídio por lipase, 109
- Hidroperóxidos, formação por lipoxigenase, 141
- Hot break*, 50

I

- Indústrias, tecnologia enzimática, 2
- Instabilidade das enzimas, 12
- Intolerância à lactose, produtos, 58
- Invertases, 62-68
 - aplicação industrial, 65
 - - frutoligosacarídeos, 66
 - - lactossacarose, 66
 - fontes e características, 63
 - métodos de detecção da atividade, 68
 - substrato, 63
- Invertebrados, 15
- Iogurte, 59
- Isoamilase, 28
- Isomaltoligosacarídeos, 36
- Isomerase, 11

K

- Kluyveromyces lactis*, 57, 58, 93
- Krebs, ciclo, 157

L

- Lactases, 55-62
 - aplicação industrial, 58
 - - doce de leite, 59
 - - galactoligosacarídeos, 61
 - - ingestão ou aplicação doméstica da enzima, 58
 - - iogurte, 59
 - - leite condensado, 59
 - - leite congelado, 59
 - - leites com baixo teor de lactose, 58
 - - panificação, 59
 - - queijo, 59

- - sorvete, 59
- - xarope de glicose-galactose, 60
- fontes e características, 56
- métodos de detecção da atividade, 62
- substrato, 55
- Lactobacillus*, 71
- Lactobiose, 57
- Lactose, 55
- Lactossacarose, 66
- Lactotriose, 57
- Leite
 - baixo teor de lactose, 58
 - condensado, 59
 - congelado, 59
- Leucodopacroma, 129
- Leuconostoc mesenteroides*, 73
- Liase, 11
- Licopeno, estrutura, 174
- Ligase, 11
- Lipase, 107-123
 - animais, 114
 - aplicação industrial, 115
 - - compostos opticamente ativos e resolução de racematos, 121
 - - formulação de detergentes, 12
 - - margarina, produção, 117
 - - maturação acelerada de queijos, 115
 - - óleos e gorduras estruturados, produção, 116
 - - panificação, 115
 - - síntese de aromas, 120
 - - surfactantes não-iônicos, produção, 118
 - - tratamento de efluentes, 122
 - atividade, métodos de detecção, 123
 - características gerais, 109
 - enantioseletividade, 112
 - fontes principais, 113
 - hidrólise de triglicerídeo, 109
 - microbianas, 114
 - modo de ação, 109
 - rancidez hidrolítica, 114
 - reações catalisadas, 110
 - regioseletividade, 111
 - seletividade de substrato, 112
- Lipoxigenases, 140-143
 - aplicação industrial, 142
 - atividade, métodos de detecção, 150
 - fontes, 140
 - importância em alimentos, 142
- Liquefação, 52

Lisolecitina, 119
 Lisossomos, 206
 Lisozima, 69

M

Maceração, 53
 Macromoléculas hidrolisadas por enzimas, 6
 Maltodextrinas, 33
 Maltotriose, extremidade redutora, 22
 Manteiga de cacau, 117
 Margarina, produção, 117
 Maturação acelerada de queijos, 93
 Melesitose, estrutura, 65
 Metaloproteases, 81
 Microrganismos, 15
 Miofibrilas, 202
 Miofilamentos, 202
 Miosina, 210
 Mitocôndrias, 206
 Monoglicerídeos, 118
 Músculos

- composição, 193
- conversão em carne (fases), 217
- - pós-rigor, 217
- - pré-rigor, 217
- - rigor *mortis*, 217
- esquelético, contração, 211

Mycobacter, 81

N

N-acetil-cisteína, 135
 N-acetil-glicosaminidase, 69
 Neurônio, diagrama, 195
Novozymes, 4, 5
 Núcleos, tecido muscular, 202

O

Off-flavors, 138, 142
 Óleos, produção, 116
 Oxidorredutases, 11, 125-151

- ascorbato-oxidases, 148
- atividade, métodos de detecção, 149
- características gerais, 126
- catalases, 143
- glicose-oxidases, 145
- lipoxigenases, 140-143
- modo de ação, 126
- peroxidases, 136-140

- polifenol-oxidases, 127
- xantina-oxidases, 147

P

Panificação, produtos

- amilase, 30
- lactases, 59
- lipases, 115
- proteases, 96

Papáina, 82

Pectato, 41, 47

Pectina, 40

- estrutura, 41

Pectinaesterase, 42, 47, 49

Pectinaliases, 44

Pectinases, 38-45

- comerciais, 44
- fontes, 41, 45
- resumo, 44
- substrato, 39

Penicillium oxalicum, 46

Pepsina, 83

Perimísio, 195

Peroxidases, 136-140

- aplicação industrial, 139
- atividade, métodos de detecção, 150
- fontes, 136
- importância em alimentos, 138

PH, pós-morte no músculo, 220

Polifenol-oxidases, 127-136

- ação sobre substrato
- - monofenol, 128
- - o-difenol, 18
- aplicação industrial, 35
- atividade, métodos de detecção, 149
- escurecimento enzimático, 132
- estrutura química de alguns substratos naturais, 131
- fontes, 128
- possíveis substratos em diferentes vegetais, 130

Poligalacturonase, 43, 49

Potencial de ação, 212

Pré-abate, fatores que afetam a qualidade da carne, 223

- hereditariedade, 223
 - idade, 223
 - localização do músculo, 223
 - manejo, 223
- Precipitação isoelétrica, 91
- Preço alto das enzimas, 11

Produtos hortícolas, transformações bioquímicas após a colheita, 153-190

- amadurecimento
- - mudanças bioquímicas, 169
- - - ácidos, 179
- - - carboidratos, 181
- - - coloração, 169
- - - compostos fenólicos, 177
- - - compostos voláteis, 175
- - - vitaminas, 179
- - respiração (fator de influência), 155-169
- brotações, 155
- flores, 154
- folhas, 154
- frutos, 155
- minimamente processados, 183
- - conservação, 185
- - mudanças bioquímicas, 183
- raízes, bulbos e tubérculos, 154

Proteases, 77-103

- ação, 78
- animais, 83
- aplicação industrial, 85
- - amaciamento da carne, 86
- - clarificação de cerveja, 85
- - coagulação do leite, 89
- - maturação acelerada de queijos, 93
- - modificação de proteínas, 98
- - panificação, 96
- - síntese de aspartame, 102
- aspárticas ou ácidas, 80
- características gerais e modo de ação, 79
- fontes e principais características, 81
- método de detecção da atividade, 103
- microbianas, 85
- sulfidrílicas, 80
- vegetais, 82

Proteínas

- miofilamentos, 209
- - actina, 209
- - miosina, 210
- - tropomiosina, 209
- - troponina, 209
- modificação, 98
- - hidrólise, 98
- - reestruturação, 101
- - síntese, 100

Proteólise limitada, 91

Pseudomonas aeruginosa, 81

Pululanase, 29

Q

- Qualidade das carnes, maturação, 225
 - embalagem à vácuo, 227
 - rápida, 227
 - seco, 227
- Queijo, 59
 - maturação acelerada, 115
- Quimotripsina, 84
- Quitina, 70
- Quitinases, 69
 - A, 69
 - aplicação industrial, 70
 - B, 69
 - métodos de detecção da atividade, 72
 - substrato, 70
- Quitobiase, 70
- Quitosana, 70
- Quitosanases, 69
- Quitosanobiase, 71

R

- Rafinose, estrutura, 64
- Raízes, 154
- Rancidez hidrolítica, 114
- Regiosseletividade, 111
- Relaxamento muscular, 215
- Renina, 83
 - microbianas, 92
- Respiração, 156
 - conceito, 156
 - etapas, 156
 - - cadeia transportadora de elétrons, 158
 - - ciclo de Krebs, 157
 - - glicólise, 156
 - - fatores que afetam, 160
 - - concentração gasosa, 167
 - - danos mecânicos, 168
 - - etileno, 160
 - - temperatura, 165
 - - padrões de atividade, 159
 - - frutos climatéricos, 159
 - - frutos não-climatéricos, 159
- Retículo sarcoplasmático, 205
- Rhizomucor*
 - *miebei*, 92
 - *pusillus*, 92
- Rhizopus*, 28

S

- Sabor, alterações, 185
- Sacarificação, 34
- Sacarose, 63
- Saccharomyces cerevisiae*, 93
- Sarcolema, 201
- Sarcoplasma, 201
- Seletividade de substrato, 112
- Serina-proteases, 80
- Serratia*, 81
- Soja, 99
- Sorvete, 59
- Streptovorticillium moharaense*, 102
- Substrato
 - amilase, 23
 - celulasas, 45
 - invertases, 62
 - lactases, 55
 - pectinases, 39
 - quitinase, 70
- Sulfitos, 133
- Surfactantes não-iônicos, produção, 118

T

- Taninos, 177
- Tecidos, 193
 - conjuntivo, 195
 - - adiposo, 199
 - - propriamente dito, 196
 - epitelial, 194
 - muscular, 199
 - - cardíaco, 207
 - - esquelético, 200
 - - - complexo de Golgi, 206
 - - - lisossomos, 206
 - - - miofibrilas, 202
 - - - miofilamentos, 202
 - - - mitocôndrias, 206
 - - - núcleos, 202
 - - - retículo sarcoplasmático, 205
 - - - sarcolema, 201
 - - - sarcoplasma, 201
 - - - túbulos T, 205
 - - liso, 206
 - nervoso, 194
- Tecnologia enzimática, 2
 - impacto das novas aplicações, 3
 - indústrias, 2

Temperatura, 165

- carcaças no pós-abate, 227
- mínima de segurança, 166

Textura

- alterações, 185
- carnes, técnicas para minimizar os problemas, 230
- - estimulação elétrica, 231
- - processamento acelerado, 230
- - suspensão em posição especial, 231

Tirosina, 129

Transferase, 11

Transformações bioquímicas em produtos
hortícolas após a colheita, 153-190

- amadurecimento
- - ácidos, mudanças, 179
- - carboidratos, mudanças, 181
- - coloração, mudanças, 169-175
- - compostos fenólicos, mudanças, 177
- - compostos voláteis, mudanças, 175
- - respiração (fator de influência), 155-169
- - vitaminas, mudanças, 179
- brotações, 155
- flores, 154
- folhas, 154

- frutas e hortaliças minimamente processadas, 183

- - conservação, 185
- - mudanças bioquímicas, 183
- frutos, 155
- raízes, bulbos e tubérculos, 154

Tripsina, 84

Tropomiosina, 209

Troponina, 209

Tubérculos, 154

Túbulos T, 205

V

Vitaminas, 179

X

Xantina-oxidases, 147

- fontes, 147
- importância em alimentos, 148

Xarope

- glicose, 34
- glicose-galactose, 60
- maltose, 35